

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

yPtpa1p, une protéine impliquée dans la résistance aux dommages
oxydatifs interagit avec un membre de la famille des chaperones
DnaJ

Par
Isabelle Brodeur
Département de microbiologie et immunologie,
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)

MARS 2000

© Isabelle Brodeur, 2000



W
4
U58
2000
V.022

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Titre de la thèse: Les protéines impliquées dans la résistance aux dommages oxydatifs induits par le peroxyde d'hydrogène dans la famille des chaperonnes
Date:

Le Docteur
Faculté de médecine
Département de microbiologie et immunologie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en sciences (M.Sc.)

1997-1998

0-1000-1000-1000



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

yPtpa1p, une protéine impliquée dans la résistance aux dommages
oxydatifs interagit avec un membre de la famille des chaperones
DnaJ

présenté par:

Isabelle Brodeur

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Dindial Ramotar
Dr Elliot A. Drobetsky
Dr Pierre Belhumeur
Dr Guy Lemay

Mémoire accepté le: ' .

SOMMAIRE

Le gène *hPTPA1* code pour un activateur de phosphotyrosyl phosphatase et il existe deux homologues chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, soit *yPTPA1* et *yPTPA2*. *yPTPA1* est requis pour la protection des cellules lorsque traitées au 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) ainsi qu'irradiées aux UVA. En effet, un mutant de délétion $\Delta yptpa1$ est caractérisé par sa sensibilité aux deux agents mentionnés ci-haut (Ramotar et al., 1998). Le 4-NQO forme des adduits encombrants dans l'ADN ainsi que des dommages oxydatifs. Les UVA quant à eux ne produisent que de l'oxygène singulet qui va attaquer l'ADN et former des dommages oxydatifs également. Nos résultats suggèrent que la sensibilité au 4-NQO du mutant $\Delta yptpa1$ est médiée par les dommages oxydatifs plutôt que par les lésions encombrantes.

Puisque hPtpa1p est un activateur de phosphatase, il serait logique de penser que yPtpa1p possède une fonction similaire. Afin d'identifier quelle phosphatase est activée chez la levure par yPtpa1p, le système du double-hybride a été utilisé pour identifier ce partenaire. Le criblage a révélé non pas une phosphatase, mais bien ce qu'on croit être une chaperone basée sur sa séquence en acides aminés et la présence du domaine J, consensus à travers tous les membres de la famille des chaperones DnaJ. Puisqu'il existe une forte homologie entre cette protéine et la chaperone Ydj2p nous l'avons appelée Ydj2p.

Pour caractériser plus amplement l'interaction entre yPtpa1p et Ydj2p, une mutagenèse aléatoire sur yPtpa1p a été réalisée pour trouver quels acides aminés sont essentiels au contact des deux protéines et si cette interaction est requise pour la résistance au 4-NQO. Il appert que le glutamate 149 est requis pour l'interaction yPtpa1p-Ydj2p, mais que *yptpa1* muté à cette position et transformé dans un mutant $\Delta yptpa1$ complémente la déficience des cellules sous un traitement au 4-NQO. Contrairement au résultat précédent, une mutation à la glycine 200 de *yptpa1* abolit la résistance au 4-NQO tout en maintenant une interaction avec Ydj2p. Nous pouvons donc conclure que yPtpa1p n'exerce pas sa fonction dans la réparation de l'ADN via son interaction avec Ydj2p. Même si l'interaction avec yPtpa1p-Ydj2p est bloquée par des mutations dans yPtpa1p, yPtpa1p muté est capable de conférer aux cellules la résistance nécessaire suite à un traitement avec le 4-NQO.

Pour localiser yPtpa1p et Ydj2p dans la levure, une fusion avec la protéine de fluorescence verte (GFP) a été observée sous microscope. Il en résulte que la protéine

yPtpa1p est cytoplasmique et que Ydj2p se retrouve dans le noyau et un peu dans le cytoplasme. La double localisation de Ydj2p est commune à plusieurs chaperones qui font la navette entre ces deux espaces.

Afin de mieux définir le rôle de Ydj2p dans la levure, il fut nécessaire de construire un mutant de délétion de *ydj2*. Ce mutant n'est pas viable dans une cellule haploïde, seulement dans une cellule diploïde. Il s'agit de la deuxième chaperone à être essentielle pour la vitalité de *S. cerevisiae*, l'autre étant Sis1p (Luke et al., 1991).

En conclusion, la protéine cytoplasmique yPtpa1p est donc requise à la survie des cellules face au 4-NQO et aux UVA, mais elle pourrait avoir un autre rôle qui la ferait interagir avec la chaperone essentielle Ydj2p.

AVANT-PROPOS

L'introduction de ce mémoire est une synthèse bibliographique portant sur quatre parties. La première est une revue des conséquences qu'ont les ultraviolets sur les cellules, du potentiel mutagène de ceux-ci et quels sont les moyens de réparer leurs dommages. Viendra par la suite, la caractérisation du mutagène 4-nitroquinoline 1-oxide, une synthèse sur les familles de phosphatase pour finir avec les types de chaperones cellulaires. Le caractère disparate de cette introduction est nécessaire à la bonne compréhension des résultats et de la discussion.

On trouvera en annexe I l'article ayant servi de tremplin à la recherche sur l'activateur de phosphotyrosyl phosphatase yPtpa1p.

Annexe I: Dindial Ramotar, Édith Bélanger, Isabelle Brodeur, Jean-Yves Masson, and Elliot A. Drobetsky, (1998), A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 273:34, 21489-21496.

REMERCIEMENTS

Après avoir terminé mon baccalauréat, il était évident que faire une maîtrise consistait pour moi une suite logique à mes études. Pour parvenir à mes fins, j'eus la chance de rencontrer les Drs Elliot A. Drobetsky et Dindial Ramotar qui, conjointement ont accepté de me prendre dans leur laboratoire. Je les remercie tous les deux de m'avoir permis de faire mes premiers pas en recherche. Merci également aux Drs Pierre Belhumeur et Guy Lemay pour avoir fait la correction de mon mémoire de maîtrise.

Fidèle du bac à la maîtrise, Anouk (et les tables du Santropol...) ont écouté mes doléances ainsi que mes éclats de joie scientifiques. La vie de labo m'a fait découvrir des personnes intéressantes, charmantes, voire édifiantes. Celles avec qui j'ai échangé sur nos travaux et plus encore, Caroline Léger, Ratsavarinh Vongsamphanh et bien sûr, Anick Leduc. Elles ont su alléger des après-midis et élargir mes connaissances. Pendant un an et demi, Marc-André Raymond m'a aidé et soutenu. Merci d'avoir partagé tes connaissances informatiques et bactériologiques.

J'eus la chance et le bonheur de cotoyer un mentor extraordinaire en la personne du Dr Jean-Christophe Hoflack pendant deux ans. Ses conseils, ses stratégies, ses nombreuses discussions sur nos projets respectifs ainsi que la transmission de son savoir m'ont donné les outils nécessaires pour avancer beaucoup plus facilement au travers les méandres de la biologie moléculaire. Merci pour l'aide inestimable que tu m'as apportée.

Je voudrais dédier un merci tout spécial à une personne qui d'abord au tout début, puis à la toute fin de ma maîtrise, a guidé et orienté mes recherches. Une personne qui m'a insufflé confiance, courage et inspiration pour l'écriture. Une personne qui se vit incombier la fastidieuse tâche de corriger mon mémoire. Une personne pour qui j'ai beaucoup d'admiration: le Dr Jean-Yves Masson.

Je pourrais écrire des pages sur les deux prochaines personnes, mais concision oblige. Mon père Guy et ma mère Claire m'ont toujours encouragée à aller au-delà de mes objectifs et à me surpasser. "Vingt fois sur le métier remettez votre ouvrage, polissez-le sans cesse et le repolissez". Tel est, entre autre, ce que je retiens des sages conseils parentaux. Peu importe les décisions, ils m'ont toujours épaulée et je les en remercie sincèrement.

La dernière année de ces travaux a été rendue possible grâce au soutien financier de la Société de Recherche sur le Cancer (CRS).

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
AVANT-PROPOS	v
REMERCIEMENTS	vi
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES FIGURES	xv
I. INTRODUCTION.....	1
1.1 Le spectre solaire et les rayons le composant: subdivision.....	2
1.2 La régulation des gènes par les UVC (254nm) chez la levure et les cellules de mammifères.	3
1.2.1 Mécanismes de signalisation originant de la membrane ou du noyau suite à une exposition aux ultraviolets.....	3
1.3 La régulation des gènes par les UVB chez la levure et les cellules de mammifères.	4
1.4 La régulation des gènes par les UVA chez la levure et les cellules de mammifères.	5
1.5 La protection des cellules face aux UVA, UVB et UVC.....	7
1.6 Les lésions causées à l'ADN par les rayons X	7
1.7 Les lésions causées à l'ADN par les ultraviolets de type C (254nm).....	8
1.7.1 Les dimères de cyclobutane pyrimidines.....	9
1.7.2 Les photoproduits (6-4) pyrimidine-pyrimidone.....	11
1.7.3 Les thymines glycols	12
1.8 Les lésions causées à l'ADN par les ultraviolets de type B (290-320nm).....	13
1.9 Les lésions causées à l'ADN par les ultraviolets de type A (320-400nm).....	14
1.9.1 Les 8-oxo-7,8-dihydroguanines.....	16
1.9.2 Les bris simple brin	16
1.9.3 Les dimères de pyrimidines	16
1.10 La réparation de l'ADN.....	17
1.10.1 La réparation des dimères de pyrimidines.....	17
1.10.1.1 La réparation par photoréactivation	17
1.10.1.2 La réparation par excision de nucléotides.....	18
1.10.1.3 La réparation liée à la transcription.....	21
1.10.1.4 L'état de condensation de l'ADN.....	22
1.10.2 La réparation des photoproduits (6-4).....	23
1.10.3 Déficience de la voie de réparation par excision de nucléotide	24

1.10.4	La réparation des espèces réactives oxygénées.....	24
1.10.4.1	La réparation par excision de base de type “short patch”	24
1.10.4.2	La réparation par excision de bases de type “long patch”.....	26
1.10.4.3	La réparation des 8-oxo-guanines.....	28
1.10.4.4	La réparation des thymines-glycols.....	29
1.10.5	D’une voie de réparation à l’autre.....	30
1.10.6	Les bris simple brin	32
1.10.7	Les bris double brin.....	32
1.11	La réponse cellulaire aux divers agents	33
1.11.1	La régulation des gènes par le stress oxydant	34
1.12	Le 4-nitroquinoline 1-oxide	37
1.12.1	Le mécanisme d’activation du 4-nitroquinoline 1-oxide.....	37
1.12.2	La mutagénèse occasionnée par le 4-NQO	39
1.12.3	L’exclusion cellulaire du 4-NQO	41
1.12.4	La réparation des lésions induites par le 4-NQO	43
1.13	Les phosphatases cellulaires	44
1.13.1	Les protéines sérine/thréonine phosphatases.....	44
1.13.1.1	Les protéines reliées à la famille des PP2A.....	46
1.13.1.2	Les activateurs de phosphatases.....	46
1.13.2	Les protéines-tyrosine phosphatases.....	47
1.13.3	Les protéines phosphatases et la réparation d’ADN	48
1.14	Les chaperones cellulaires.....	48
1.14.1	Les Hsp90	49
1.14.2	Les sHSP.....	49
1.14.3	Les Hsp70	50
1.14.3.1	Les DnaJ.....	51
1.14.4	Les chaperones et la réparation d’ADN.....	52
1.15	Problématique et objectifs de ce travail.....	52
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	54
2.1	Souches de bactéries et de levures utilisées.....	55
2.2	Les milieux de culture.....	55
2.3	Plasmides utilisés lors de l’étude.....	56
2.4	Construction des mutants de délétion de <i>YDJ2</i>	58
2.5	Préparation des cellules compétentes et transformation de <i>E. coli</i>	58
2.6	Préparation d’ADN plasmidique d’ <i>E. coli</i>	59
2.7	Préparation d’ADN chromosomique de <i>S. cerevisiae</i>	59

2.8 Transformation de cellules de <i>S. cerevisiae</i>	60
2.9 Préparation d'ADN plasmidique de <i>S. cerevisiae</i>	61
2.10 Exécution du double-hybride chez <i>S. cerevisiae</i>	61
2.11 Pétris de gradient.....	61
2.12 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	62
2.13 Buvardage Southern.....	62
2.14 Analyse informatique des séquences d'ADN.....	63
2.15 Préparation des mutants aléatoires de <i>ytpa1</i>	63
2.16 Séquençage automatique.....	63
2.17 Préparation des cellules pour visualisation au microscope.....	63
2.18 Courbes de survie.....	64
III. RÉSULTATS.....	65
3.1 <i>yPtpa1</i> est important pour la survie de la cellule face au 4-NQO et aux UVA.....	66
3.2 La protéine <i>yPtpa1p</i> interagit avec un membre de la famille des chaperones, <i>Ydj2p</i>	67
3.3 Acides aminés essentiels pour l'interaction <i>yPtpa1</i> - <i>Ydj2p</i>	71
3.4 Localisation cellulaire des deux protéines (<i>yPtpa1p</i> et <i>Ydj2p</i>).....	73
3.5 Déletion du gène <i>YDJ2</i> afin d'étudier sa fonction chez la levure.....	74
IV. DISCUSSION.....	79
4.1 <i>yPtpa1p</i> est nécessaire pour la protection des cellules contre les dommages oxydatifs causés par le 4-NQO et les UVA.....	80
4.2 Quel serait le rôle de <i>yPtpa1p</i> contre l'action du 4-NQO ou des UVA?.....	81
4.3 <i>yPtpa1p</i> interagit avec un membre de la famille des chaperones.....	82
4.4 Acides aminés essentiels pour l'interaction entre <i>yPtpa1p</i> et <i>Ydj2p</i>	83
4.5 Localisation cellulaire de <i>yPtpa1p</i> et <i>Ydj2p</i>	87
4.6 Déletion du gène <i>ydj2</i> pour voir ses fonctions chez la levure.....	88
V. CONCLUSION.....	89
VI. ANNEXE I.....	92
VII. RÉFÉRENCES.....	101

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Relative à la biologie

4-HAQO:	4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide
4-NQO:	4-nitroquinoline 1-oxide
6-4PP:	(6-4) pyrimidine-pyrimidone
8-O-G:	8-oxo-guanine
A:	adénine
ADN:	acide déoxyribonucléique
AP:	apurinique, apyrimidique
ARN:	acide ribonucléique
ARNt:	acide ribonucléique de transfert
ATP:	adénine triphosphate
BER:	base excision repair
C:	cytosine
Cellule (lymphocyte) T:	provenant du thymus
CPD:	cyclobutane pyrimidine dimer
CpG:	cytosine suivie d'une guanine par un lien phosphodiester
CS:	Cockayne syndrome
CuII:	cuiivre ²⁺
dNTP:	déoxynucléotides triphosphates
DTT:	dithiothréitol
e ⁻ :	électron
EDTA:	acide éthylène diamine tétraacétique
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
G:	guanine
GFP:	green fluorescent protein
GMP:	guanine monophosphate
GTP:	guanine triphosphate
H ₂ O:	eau
H ₂ O ₂ :	peroxyde d'hydrogène
ICAM-1:	intercellular adhesion molecule 1
IL:	interleukine
JNK:	c-jun amino terminal kinase
kb:	kilo paires de bases

kDa:	kilo Dalton
-LAU:	milieu minimal sans leucine, adénine, uracile
-LU:	milieu minimal sans leucine, uracile
-LUH:	milieu minimal sans leucine, uracile, histidine
-LU-X-gal:	milieu minimal sans leucine, uracile additionné de X-gal
MAP:	mitogen activated protein
Mg ²⁺ :	magnésium ²⁺
MgCl ₂ :	chlorure de magnésium
mutant XΔ::LEU2 ou URA3:	mutant de délétion X par insertion de la cassette LEU2 ou URA3
NAD(P)H:	forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NER:	nucleotide excision repair
O ₂ :	dioxygène
O ₂ ^{•-} :	radical anion superoxyde
¹ O ₂ :	oxygène singulet
OH•:	radical hydroxyl
ONPG:	o-nitrophényl-βD-galactopyranoside
ORF:	open reading frame
PCNA:	proliferating cell nuclear antigen
PCR:	polymerase chain reaction
PKC:	protéine kinase C
pH:	potentiel hydrogène
PMSF:	phénylméthylsulfonyl fluoride
PP _i :	pyrophosphate
PTPase:	phosphotyrosine phosphatase
NF-κB:	nuclear factor κB
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pompe</i> :	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS:	sodium dodécyl sulfate
SGD:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> genetic database
T:	thymine
TBP:	TATA binding protein
TCR:	transcription coupled repair
TE:	tampon Tris-HCl/EDTA
TFIIH:	transcription factor II, sub-unit H
Tg:	thymine glycol

TTD:	trichothiodystrophie
UV:	ultraviolet
UVA:	ultraviolet de type A
UVB:	ultraviolet de type B
UVC:	ultraviolet de type C
VIH:	virus d'immunodéficience humaine
XP:	Xeroderma pigmentosum

Unités de mesure

°C:	degré celcius
cpm:	compte par minute
DO _x :	densité optique à une longueur d'onde x
g:	gramme
h:	heure
µl:	microlitre
mg:	milligramme
ml:	millilitre
µm:	micromètre
mM:	millimolaire
ng:	nanogramme
nm:	nanomètre
rpm:	revolution per minute
sec:	seconde
v/v:	volume/volume

Autres

o/n:	overnight
------	-----------

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Comparaison des enzymes du NER à travers l'évolution selon Wood, 1997....	21
Tableau II: Comparaison des enzymes du "short patch" BER à travers l'évolution	30
Tableau III: Interaction entre yPtpa1p et Ydj2p et Ydj2p12-436.....	71
Tableau IV: Substitution d'acides aminés retrouvée dans yPtpa1p	73

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Spectre des radiations solaires.....	2
Figure 2: Pénétration des UV dans les couches épidermales.....	6
Figure 3: Exemples de dommages causés par les radiations dont la thymine glycol et la 8 hydroxy-guanine (8-oxo-guanine).....	8
Figure 4: Structure des dimères de pyrimidines.....	10
Figure 5: Structure des photoproduits (6-4) pyrimidine-pyrimidone.....	12
Figure 6: Réparation par excision de nucléotides (NER) chez l'humain et la levure.....	19
Figure 7: Réparation par excision de bases (BER).....	26
Figure 8: Comparaison entre le BER de type “short patch” et “long patch”.....	28
Figure 9: Chevauchement des voies de réparation pour une base endommagée chez <i>S. cerevisiae</i>	31
Figure 10: Modèle illustrant la recombinaison homologue chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
Figure 11: A) Production des dérivés réactifs de l’oxygène (ROS) par les UVA et B) selon les mécanismes endogènes, exogènes et détoxification de ceux-ci.....	35
Figure 12: Mécanisme d’activation <i>in vivo</i> du 4-NQO.....	38
Figure 13: Représentation des dommages à l’ADN causés par le 4-NQO activé.....	39
Figure 14: Formation de ROS par le 4-NQO.....	40
Figure 15: Détoxification du 4-NQO par la voie du glutathion.....	42
Figure 16: Modèle de la réaction cyclique des chaperones Hsp70.....	50
Figure 17: Plasmides utilisés lors de cette étude.....	58
Figure 18: Courbe de survie de la souche sauvage et de la souche délétée en <i>Δytpa1</i> face à différents mutagènes.....	67
Figure 19: Fonctionnement du test du double-hybride.....	68
Figure 20: Alignement de hDj1p, hDj2p, Ydj1p et Ydj2p.....	70
Figure 21: Sensibilité des différents mutants de yPtpa1p au 4-NQO sur pétri de gradient. 72	
Figure 22: Localisation cellulaire des protéines Imp2p (A et B), yPtpa1p (C et D) et Ydj2p (E et F).....	74
Figure 23: Délétion du gène <i>YDJ2</i> par le plasmide intégratif pIB11.....	76
Figure 24: (A) Schéma des fragments attendus suite à la recombinaison du plasmide intégratif pIB11 au locus du gène <i>YDJ2</i> . (B) Buvardage Southern sur le mutant <i>Δydj2</i> +/- dans une souche diploïde de levure.....	78
Figure 25: Alignement de la structure primaire de PTPA à travers l’évolution.....	85

Figure 26: yPtpa1p, une protéine multifonctionnelle à la fois impliquée dans la réparation de l'ADN endommagé au 4-NQO ou aux UVA ou dans une fonction cellulaire inconnue jusqu'à présent par son interaction avec Ydj2p.....91

I. INTRODUCTION

Le nombre des cancers de la peau dans la population Caucasienne (dont le Canada) est de plus en plus abondant et ce, depuis plusieurs années. Il s'agit en fait du type de cancer le plus fréquent des cancers malins présents dans la population de nos jours. Ceci est en rapport avec la mode du teint bronzé, qu'il s'agisse d'une exposition directe au soleil ou dans les salons de bronzage dès l'enfance. L'exposition répétée aux rayons solaires est néfaste et provoque plusieurs actions dans la cellule comme nous le verrons dans cette introduction. N'oublions pas que les effets des radiations sont additifs au fil des années et c'est pourquoi l'apparition de cancers n'est que tardive (de Gruijl, 1996).

1.1 Le spectre solaire et les rayons le composant: subdivision

Le spectre solaire se divise en différentes catégories de rayons. Jusqu'à 190 nm, on retrouve les rayons X et ensuite viennent les radiations dites ultraviolettes, de 190 nm à 400 nm. Ces radiations se subdivisent en ultraviolet de type A (UVA), B (UVB) ou C (UVC); de 190 nm à 290 nm, les UVC; de 290 nm à 320 nm, les UVB et de 320 nm à 400 nm, les UVA tel qu'illustré à la figure 1 (Friedberg et al., 1995). Au delà de 400 nm, il s'agit de la lumière visible et des rayons infrarouges. Un des effets remarquables des ultraviolets est l'activation de certains gènes; de certaines protéines comme nous le verrons aux sections 1.2, 1.3 et 1.4. Les différences au niveau des lésions causées par ces rayons seront discutées aux sections 1.6, 1.7, 1.8 et 1.9.

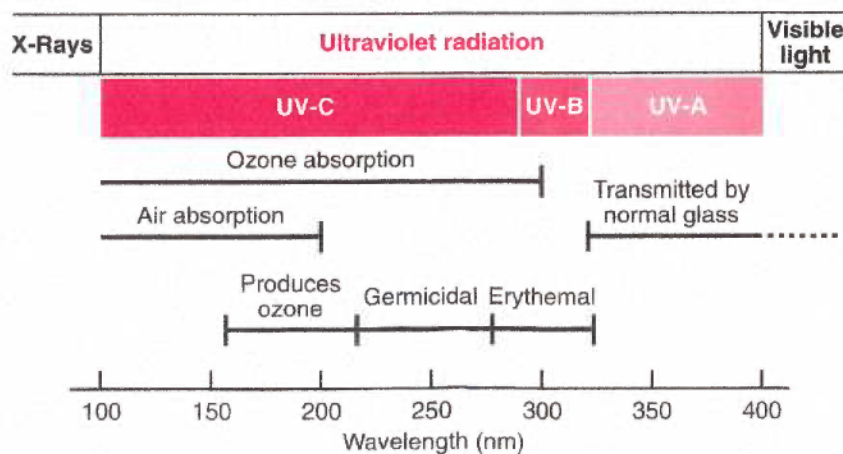


Figure 1: Spectre des radiations solaires. Figure tirée de Friedberg et al., 1995.

1.2 La régulation des gènes par les UVC (254nm) chez la levure et les cellules de mammifères.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, peu d'études ont été réalisées pour caractériser les gènes induits par l'action des ultraviolets. L'équipe de Szostak (1985) a reporté des gènes induits par l'action des UVC (254nm) (Ruby and Szostak, 1985). Par la fusion de ces gènes au gène rapporteur de la β -galactosidase, l'induction a pu être mesurée. Ils ont appelé ces gènes *DIN* pour "damage inducible gene" (Ruby and Szostak, 1985). De ces gènes, certains ont été par la suite identifiés comme faisant partie du complexe de réparation par excision de nucléotides (voir section 1.10.1.2) (Friedberg, 1985; Mieczkowski et al., 1997), comme par exemple le gène de la photolyase *PHR1* (Sebastian et al., 1990). En ce qui concerne les gènes induits ne faisant pas partie des complexes de réparation, notons l'activation de la voie de signalisation de Ras1 qui induit à son tour l'activateur de transcription Gcn4p (Engelberg et al., 1994). *GCN4* est un gène normalement induit par une carence en acides aminés ou en purines (Hinnebusch, 1984). L'activation de Ras par les UVC (254nm) se fait par un mécanisme d'origine membranaire (Engelberg et al., 1994). La réponse cellulaire suite à une irradiation aux UVC (254nm) chez la levure est similaire à une réponse suite à une altération des conditions nutritionnelles tandis que la même irradiation chez les cellules humaines est similaire à une réponse aux facteurs de croissance comme nous le verrons dans les paragraphes suivants (Coffer et al., 1995; Engelberg et al., 1994).

1.2.1 Mécanismes de signalisation originant de la membrane ou du noyau suite à une exposition aux ultraviolets

A l'instar de la levure, on retrouve des études plus exhaustives sur la régulation des gènes induits aux ultraviolets chez les cellules de mammifères. Une des réponses cellulaires primaires suite à une irradiation aux UVC (254nm) est l'activation de la tyrosine kinase SRC, qui fait partie des mécanismes d'origine membranaire induits par les UV. L'activation de la tyrosine kinase SRC est suivie par l'activation de Ha-ras et Raf-1 près de la membrane cytoplasmique (Devary et al., 1992; Donawho et al., 1994; Radler-Pohl et al., 1993). L'activation de Ras résulte en une cascade de protéines kinases telles que la "c-jun amino terminal kinase" (JNK), et ensuite c-jun, c-fos, c-myc, ATF-2, AP-1 et du "nuclear factor κ B" (NF- κ B) et entre autre, il y aura stabilisation et activation de p53 (Leonardo et al., 1994), donc stimulation de la protéine p21^{waf/cip1} qui induit l'arrêt cellulaire en G₁. Également, une dose de 50J/m² d'UVC (254 nm) et d'UVB, sur des fibroblastes de peau

activera la collagénase, la stromélysine et la métallothionéine IIA (Stein et al., 1989). Du côté immunologique, les UVC (254nm) induisent l'interleukine-1 dans les kératinocytes (Kupper et al., 1987) et peuvent provoquer l'activation du promoteur du VIH (Tyrrell, 1996). Pour l'activation de ces gènes, il est possible que les UVC (254nm) simulent les interactions facteurs de croissance/récepteur à la membrane cellulaire et ainsi, activent les récepteurs. Il en découle la transmission d'un message et l'activation d'une cascade de signaux (Tyrrell, 1996).

En ce qui concerne les effets des UV médiés par les dommages nucléaires, on peut voir une autre façon d'activer le gène *p21* est de manière *p53* indépendante tel qu'illustré dans les fibroblastes de peau de patients atteints du syndrome de Li Fraumeni. Dans ces cellules délétées en *p53*, après une irradiation aux UVC (254nm), on observe une induction de la protéine *p21* et également arrêt en G_1 (Loignon et al., 1997). D'une autre façon, les UV laissent des lésions dans les promoteurs de certains facteurs de transcription. Puisque les promoteurs sont moins bien réparés à cause de la réparation couplée à la transcription (voir section 1.10), un dommage situé dans un promoteur risque de demeurer plus longtemps que dans un gène transcrit. Il s'en suit l'apparition de protéines non voulue ou encore, l'absence de protéine dans un cas précis. Ces dommages dans les promoteurs pourront donc dérégler différents facteurs de transcription (Pfeifer, 1997).

1.3 La régulation des gènes par les UVB chez la levure et les cellules de mammifères.

Omis les gènes de réparation (voir section 1.10) il est difficile de trouver des gènes induits par les UVB chez la levure. Chez les cellules humaines, les UVB inhibent l'interféron γ activant l'expression de l'"intercellular adhesion molecule 1" (ICAM-1) selon une manière dose-dépendante (Ahrens et al., 1997). Également, les UVB activent la relâche de plusieurs cytokines telles que l'interleukine 1 (IL-1), l'interleukine 3 (IL-3), l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 8 (IL-8), les "granulocyte/macrophage colony stimulating factor" (CSF) et le "tumor necrosis factor α " (TNF α) (Schwarz and Luger, 1989). Les UVB sont également capables d'activer des membres de la famille des protéines activées par le stress comme JNK1 (par la tyrosine kinase SRC). Cependant, cette activation est moins drastique que peuvent le faire les UVC (254nm) probablement à cause de la différence de puissance des UVC (254nm) comparée aux UVB ou encore, que les récepteurs pour les deux types d'irradiation sont différents (Ramaswamy et al., 1998). Tout comme les UVC (254nm), les UVB et les UVA stabilisent la protéine *p53* chez les

kératinocytes de souris et d'humain (Campbell et al., 1993; Liu et al., 1994). Enfin la réponse des cellules face aux UVB-UVA inclut une activation des kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERKs) qui jouent un rôle dans la réponse inflammatoire par l'activation de phospholipase A₂ et de prostaglandine (Englaro et al., 1998). Le danger de toutes ces activations ou encore des dommages laissés par les UV est l'absence de réparation et/ou de contrôle. Cette absence pourra établir des cellules résistantes à l'apoptose comme on peut le voir dans les cellules irradiées aux UVB (des mélanocytes) qui font un arrêt en G₁ à cause du grand taux de la protéine p53 dans la cellule (Barker et al., 1995) et qui ont un taux de Bcl2 (inhibiteur d'apoptose) particulièrement bas (Im et al., 1998).

1.4 La régulation des gènes par les UVA chez la levure et les cellules de mammifères.

Comme dans le cas des UVB, à part des gènes de réparation (voir section 1.10) peu d'exemples de gènes induits par les UVA sont retrouvés chez la levure. Les UVA produisent majoritairement de l'oxygène singulet et c'est particulièrement cette molécule qui effectuera l'activation génique (Basu-Modak and Tyrrell, 1993; Scharffetter-Kochanek et al., 1993; Wlaschek et al., 1995). Chez les cellules humaines, les UVA induisent le promoteur du gène ICAM-1, un ligand cellulaire de surface pour les lymphocytes médiateurs des contacts entre les kératinocytes et les leucocytes durant l'inflammation. Cette induction est médiée par l'activateur de transcription AP-2 (Grether-Beck et al., 1996). Le promoteur AP-2 lui-même est induit suite aux radiations UVA et la protéine est retrouvée dans l'extrait nucléaire des cellules irradiées. On sait que les UVB induisent également le gène ICAM-1 indépendamment d'AP-2 (Grether-Beck et al., 1996). Un autre facteur de transcription est activé par les grandes longueurs d'ondes, il s'agit du NF- κ B (Vile et al., 1995). Les UVA, tout comme le font modérément les UVB, stimulent l'expression de l'interleukine 1- α , 1- β , 6 et d'une façon dose dépendante, l'interleukine 10. L'exposition aux UVA et UVB stimule le relâchement d'acide arachidonique des membranes lipidiques (Hanson and DeLeo, 1989), médie l'activation i) de la protéine kinase JNK, ii) de la protéine c-fos, iii) de la SAPK ("stress activated protein kinases") (Klotz et al., 1997), induit l'inflammation par la production d'éicosanoïdes et inhibe l'attachement de certains facteurs de croissance épidermaux à leurs récepteurs chez les souris et cellules humaines (Matsui et al., 1994). Également, les UVA augmentent le niveau cellulaire de la PKC ("protein kinase C") (Matsui and DeLeo, 1990). En plus de l'effet sur les gènes, les UVA peuvent induire des altérations ou des changements au niveau de la membrane (Gaboriau et al., 1993; Moysan et

al., 1993), du cytosquelette (Zamansky and Chou, 1987) et des protéines (Hu and Tappel, 1992). La figure 2 illustre quelques effets médiés par les différentes catégories d'ultraviolets.

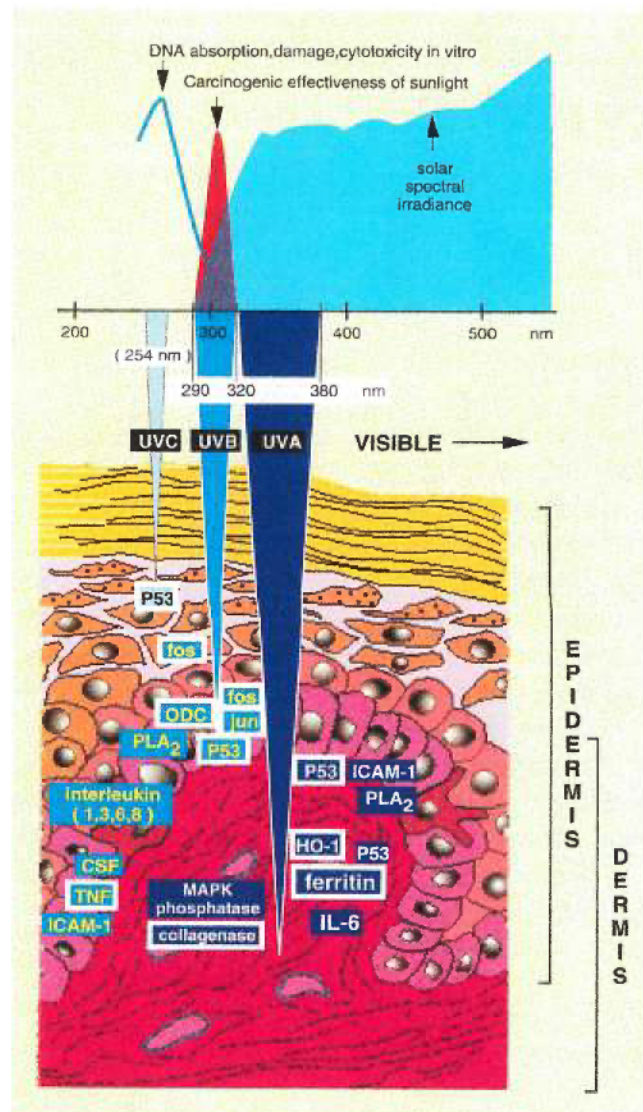


Figure 2: Pénétration des UV dans les couches épidermales. Le spectre des radiations solaires parvenant à la Terre est illustré dans cette figure de même que la représentation de la transmission de ses composants au travers la peau. La série citée des gènes induits par chaque type d'UV n'est pas exhaustive. Quand 2% des UVB pénètrent dans le derme, jusqu'à 20% des UVA y sont présents. Figure tirée de Tyrrell, 1996.

1.5 La protection des cellules face aux UVA, UVB et UVC

On pourrait penser que l'épaisseur de la peau permet de protéger les couches basales des dommages causés par les UVB (ou UVA). C'est vrai en ce qui concerne les UVC (254nm), puisque le taux de dimères de cyclobutane pyrimidines (CPD) dans les couches basales de peau humaine reconstituée est plus bas que celui retrouvé dans les couches supérieures. Par contre, lorsque la peau reconstituée est irradiée aux UVB ou UVB-UVA l'organisation en couches multiples des cellules cutanées n'influence pas la formation de CPD, donc il n'y a aucune protection contre la pénétration des rayons jusqu'à l'épiderme, pénétration qui pourra générer des mutations précurseurs de cancer (Therrien et al., 1999). La peau (tout comme la membrane chez la levure) n'étant pas un bouclier à toute épreuve contre les dommages nocifs des ultraviolets, ceux-ci pourront donc se rendre dans le noyau cellulaire et affecter l'acide déoxyribonucléique (ADN). Nous verrons aux sections 1.6, 1.7, 1.8 et 1.9 les dommages laissés par les différents types d'ultraviolets et à la section 1.10 leur mode de réparation.

1.6 Les lésions causées à l'ADN par les rayons X

Les rayons X, ou radiations ionisantes, sont des radiations électromagnétiques de petite longueur d'onde. Les dommages majeurs occasionnés par les rayons X sont des bris double et simple brin dans l'ADN ainsi que des lésions au déoxyribose et à sa base ou encore des liens covalents protéines-ADN impliquant les tyrosines et les thymines (Coogan et al., 1992; Olinski et al., 1992; Olive, 1998; Sweigert et al., 1988; Teoule, 1987; Wallace, 1998; Ward, 1990). Par la scission de l'eau, les rayons X causent des radicaux hydroxyls et qui peuvent alors attaquer l'ADN et causer ces lésions. Au niveau chromosomique, ils provoquent une déstabilisation en créant des altérations telles que des délétions transgéniques et des réarrangements tels que les translocations ou les inversions (Grossovsky et al., 1986). La réparation des dommages au nucléotide se fait par la réparation des bases mésappariées ou encore par la réparation couplée à la transcription (voir section 1.10.1.3) (Cooper et al., 1997; Fritzell et al., 1997; Leadon and Cooper, 1993; Shibutani et al., 1991). Pour ce qui est des bris de brins d'ADN, c'est en fait la réparation par excision de bases qui entre prioritairement en jeu (voir section 1.10.4.1).

1.7 Les lésions causées à l'ADN par les ultraviolets de type C (254nm)

Les UVC (254nm) font partie de la portion des radiations solaires qui ne parviennent pas à la Terre. En effet, ces rayons sont bloqués par la couche d'ozone de la stratosphère. On retrouve dans cette portion de radiations la longueur d'onde la plus absorbée par l'ADN soit 260 nm. Les principaux dommages occasionnés par les UVC (254nm) sont 70 à 80% de dimères de cyclobutane pyrimidines (CPD) ainsi que 20 à 30% de photoproduits (6-4) pyrimidine-pyrimidone (6-4PP) (voir figures 4 et 5 et sections 1.7.1 et 1.7.2) (Kaufmann and Wilson, 1994; Watanabe et al., 1985). De façon très minime, l'on retrouve également des isomères de Dewar qui sont des changements de conformation des 6-4PP (Friedberg, 1985; Mitchell and Nairn, 1989), des dommages aux purines tels les 8,8-adénines déhydrodimères et les 8-oxo-guanines (8-O-G; voir section 1.9.1) (Gasparro and Fresco, 1986; Porschke, 1973), des cytosines hydratées (Fisher and Johns, 1976) ainsi que des thymines glycols (Tg; voir section 1.7.3) (Demple and Linn, 1982; Yamane et al., 1967) (voir figure 3).

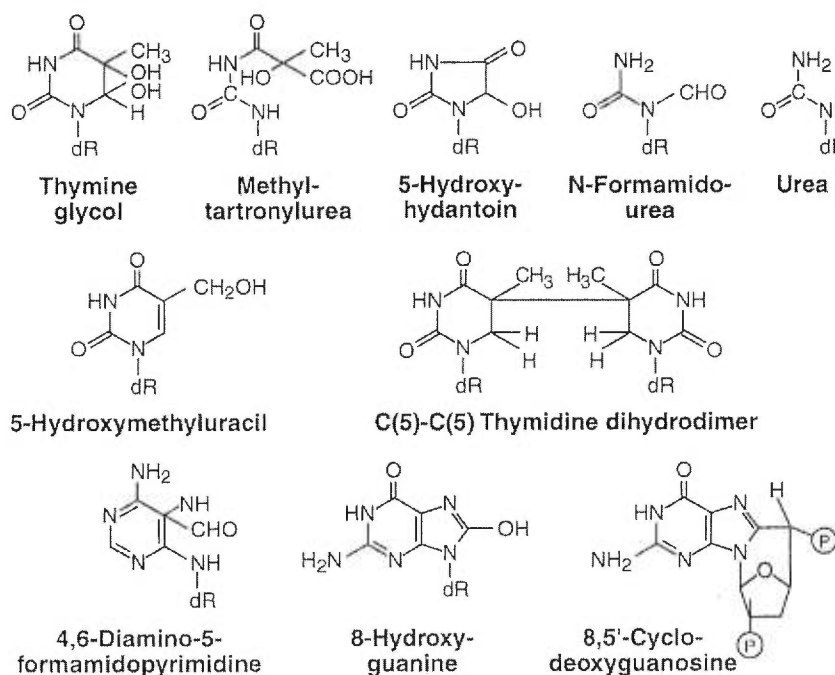


Figure 3: Exemples de dommages causés par les radiations dont la thymine glycol et la 8-hydroxy-guanine (8-oxo-guanine) Figure tirée de Friedberg et al., 1995.

1.7.1 Les dimères de cyclobutane pyrimidines

Lorsque l'ADN est exposé aux rayons UVC (254nm), il s'ensuit une absorption d'énergie qui favorise les liens covalents entre des pyrimidines adjacentes par les carbones 5 et 6 de chacune d'entre elles (Settlow, 1966). Il a été longtemps admis que la présence de CPD dans l'ADN provoquait de l'encombrement stoechiométrique, arrêtaient la polymérase d'ADN dans la fourche de réplication et qu'ils étaient des lésions non-codantes puisqu'aucune base ne pouvait s'incorporer face à de tels dommages, à cause de l'impossibilité de faire des liens hydrogène stables (Chan et al., 1985; Hayes et al., 1971; Witkin, 1976). Toutefois, Taylor et al. (1990) ont démontré que les CPD n'altéraient presque pas la structure hélicoïdale de l'ADN (Taylor et al., 1990). En effet, l'apposition du CPD ne change que d'un angle de sept degrés l'inclinaison de l'ADN (Ciarrocchi and Pedrini, 1982). Également, l'incorporation d'adénine face à des thymines préalablement liées de façon covalente est possible tout comme le démontre deux études chez *Escherichia coli* employant la polymérase I ou le fragment Klenow avec des segments ayant des CPD montrant l'incorporation de nucléotides durant la synthèse d'ADN (O'Day et al., 1992; Taylor and O'Day, 1990).

La fréquence des dimères de pyrimidines est influencée par i) le type de pyrimidine retrouvée dans la séquence d'ADN ainsi que par ii) la séquence environnante comme telle et iii) par la présence ou non de protéines sur le chromosome. En effet, la proportion de CPD varie en fonction de la présence d'une thymine ou non dans le doublet. Un plasmide irradié par une lampe à 254 nm dans des cellules humaines établit le taux suivant de CPD: thymine-thymine (T-T) 68%, thymine-cytosine (T-C) 16%, cytosine-thymine (C-T) 13% et enfin cytosine-cytosine (C-C) 3% (Mitchell et al., 1992; Tornaletti et al., 1993). Ainsi la thymine cause généralement plus de dimères qu'une cytosine. Également, les nucléotides voisins de la paire de pyrimidines peuvent affecter la présence ou l'absence de dimères. Gordon et Haseltine (1982) ont démontré que lorsque le doublet est bordé par des adénines de chaque côté, celui-ci aura une plus forte tendance à former un dimère que s'il y a d'autres types de nucléotides de part et d'autre des deux pyrimidines (Gordon and Haseltine, 1982). La séquence environnante du doublet semble aussi importante à l'apposition du dimère sans pour autant qu'il y ait de règle très stricte à ce sujet. L'absence de protéine au site potentiel permet l'accessibilité des rayons à l'ADN pour former des dommages tandis que leur présence réduit cette accessibilité et protège donc en quelque sorte l'ADN.

Les dimères de pyrimidines, lorsqu'une cytosine y est retrouvée, provoquent régulièrement des transitions cytosine:guanine en thymine:adénine (C:G→T:A), surtout si les cellules irradiées sont déficientes dans la voie d'excision de nucléotides (Sage et al., 1996). Une cause probable de ceci est la forte tendance que possède la cytosine à se déaminer et de se transformer en uracile lorsqu'elle est en dimère (Peng and Shaw, 1996; Ruiz-Rubio and Bockrath, 1989). Une autre probabilité serait que la dimérisation des cytosines présente un potentiel plus grand à bloquer la polymérase d'ADN que les dimères contenant des thymines ou de l'uracile. Ces cytosines dimériques seraient outrepassés seulement après l'avènement de la déamination, ce qui garantit une mutation (Tessman et al., 1994; Tessman et al., 1992). Par contre, la mutagénicité des dimères contenant une cytosine comparés à ceux sans cytosine n'a pas été démontrée (Horsfall et al., 1997).

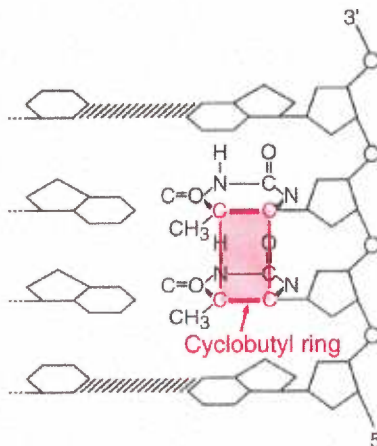


Figure 4: Structure des dimères de pyrimidines. Les dimères de cyclobutane pyrimidines sont formés dans l'ADN par l'interaction covalente de deux pyrimidines adjacentes dans la même chaîne de polynucléotides. La saturation de leur double lien 5,6 résulte en la formation d'un anneau de cyclobutyl à quatre membres liant les deux pyrimidines. Figure tirée de Friedberg et al., 1995.

1.7.2 Les photoproduits (6-4) pyrimidine-pyrimidone

Ce type de dommage n'est présent dans l'ADN que si l'on retrouve une cytosine en 3' du doublet de pyrimidine (Lippke et al., 1981) et préférentiellement avec une thymine plutôt qu'une cytosine en 5' du doublet (Bourre et al., 1987). Lorsqu'une cytosine est impliquée dans le doublet ou en amont, il y aura rapidement déamination de celle-ci en uracile ce qui créera une transition C:G→T:A lors de la prochaine réplication (Barak et al., 1995). Le photoproduit 6-4 se forme lors d'une attaque nucléophile du carbone 4 de la pyrimidine en 3' sur le carbone 6 de la pyrimidine en 5' d'où le nom (6-4) tout en créant une grande distorsion ayant un angle de 44° par rapport à l'ADN (Kim and Choi, 1995; Taylor et al., 1988). Ceci peut éventuellement bloquer la réplication de l'ADN, mais d'une façon moins efficace que pour les CPD (Kamiya et al., 1998). Plusieurs équipes ont démontré que la présence d'une cytosine méthylée dans le doublet inhibe la formation des 6-4PP dans l'ADN (Brash and Haseltine, 1982; Glickman et al., 1986; Pfeifer et al., 1991). La signature moléculaire des UVC (254nm) est des transitions C:G→T:A ou encore CC→TT (Brash et al., 1991) et ce, chez la levure comme chez l'humain. Ces mutations dans la levure étant toujours occasionnées à des sites dipyrimidiques; études ayant été faites en exprimant le gène p53 dans la levure et en analysant le spectre de mutation de celui-ci après une irradiation aux UVC (254nm) (Inga et al., 1998; Moshinsky and Wogan, 1997). Dans les cellules de rongeur, le gène *APRT* (adénine phosphoribosyltransférase) a été utilisé pour caractériser les mutations occasionnées par les UVC (254nm). Il appert que dans ce locus, les mutations G:C→T:A sont causés par les photoproduits (6-4) (Drobetsky et al., 1987). De plus, les sites 5'-TCC-3' sont préférentiels pour le ciblage des mutations (Drobetsky and Sage, 1993).

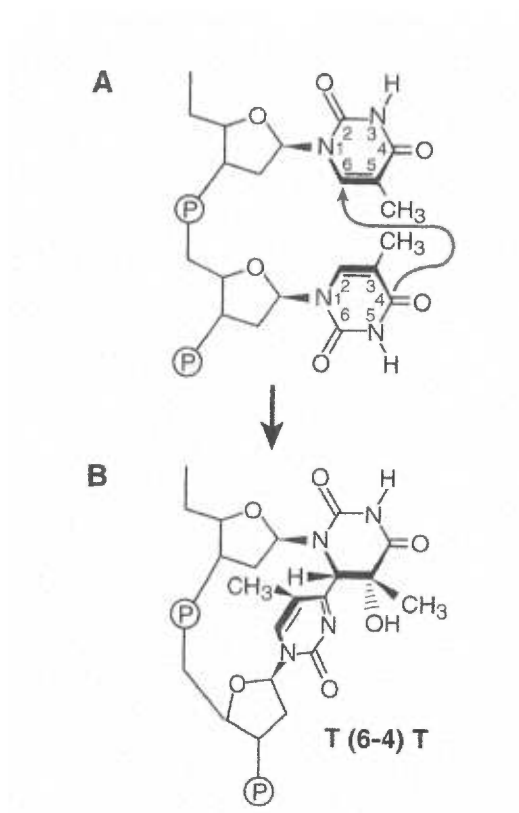


Figure 5: Structure des photoproduits (6-4) pyrimidine-pyrimidone. Les photoproduits (6-4) sont le produit de l'attaque nucléophile du carbone 4 au carbone 6 d'une pyrimidine adjacente. Figure tirée de Friedberg et al., 1995.

1.7.3 Les thymines glycols

Les thymines glycols, aussi induites par les rayons X, (voir figure 3) proviennent de la saturation du double lien 5-6 de la thymine (Demple and Linn, 1982; Yamane et al., 1967). Ils bloquent la réplication de l'ADN polymérase ce qui cause l'arrêt du cycle cellulaire, pouvant conduire à la sénescence cellulaire (Demple and Harrison, 1994). Par contre, dans des contextes particuliers tels que 5'-C(Tg)A-3' ou 5'-C(Tg)C-3', le blocage des polymérases n'est pas observé *in vitro* (Clark and Beardsley, 1989; Hayes and LeClerc, 1986). Après le passage de la polymérase, la lésion peut induire une transition T:A→C:G, mais tout de même à une fréquence très faible de 0,3-0,4% (Basu et al., 1989). Cette faible mutagénicité peut aussi être attribuée à la faculté de la thymine glycol de s'associer malgré tout avec une adénine durant la réplication (Evans et al., 1993).

1.8 Les lésions causées à l'ADN par les ultraviolets de type B (290-320nm)

Les UVB, contrairement aux UVC (254nm) ne sont pas entièrement bloqués par la couche d'ozone. Alors qu'une portion est arrêtée, une autre portion parvient à la Terre. En considérant l'énergie émise, les UVB sont 20 fois moins puissants que les UVC (254nm). Cependant, pour une même dose à l'ADN, les UVB sont beaucoup plus mutagéniques que les UVA (Drobetsky et al., 1995). Les dommages laissés par les UVB se caractérisent majoritairement par des dimères de pyrimidines ainsi que des photoproduits 6-4 pyrimidine-pyrimidone (Jones et al., 1992). L'ADN possède le potentiel idéal pour absorber de l'énergie émise par les UVB, considérant les rayons atteignant la Terre (Setlow and Woodhead, 1994). C'est dans ce sens que l'on dit que les UVB sont des inducteurs directs de dommages à l'ADN. Les UVB, tout comme les UVC (254nm), causent des mutations aux sites dipyrimidiques (Brash et al., 1987). En utilisant le gène *SUP4-o* de *S. cerevisiae*, Kunz et Armstrong (1998) ont déterminé que les mutations majeures causées par les UVB étaient des transitions C:G→T:A. 94% de ces transitions se sont avérées être produites à des sites TC ou CC. Egalement, au-delà de 80% de ces transitions se retrouvent sur le brin non-transcrit de *SUP4-o* (Kunz and Armstrong, 1998).

Chez l'humain, on retrouve une signature moléculaire similaire c'est-à-dire des changements C:G→T:A ou encore en tandem, CC→TT (Hauser et al., 1986). Ainsi la protéine p53, lorsque mutée dans les cancers de cellules squameuses ou basales de la peau, démontre de telles mutations (Brash et al., 1991; Ziegler et al., 1993). Toutefois, p53 mutée dans d'autres cellules cancéreuses n'a pas une prédominance de ces mutations particulières. Pour ce qui est des mutations, l'équipe de Pfeifer (1997) a démontré que la présence d'une cytosine méthylée serait favorisée pour l'addition d'un dimère (CPD) suite à des irradiations UVB. Comme les cytosines méthylées ne se retrouvent que dans un contexte de cytosine-lien phosphodiester-guanosine (CpG), ceci peut expliquer pourquoi les sites préférentiels de mutations dans p53 sont des sites CpG à quelques exceptions près (Drouin and Therrien, 1997; Tommasi et al., 1997). Les UVB induisent de l'immunosuppression et peuvent prévenir le rejet des greffes versus l'hôte (qui est médié par les lymphocytes T). Sous l'action des UVB, des lymphocytes non-stimulés ne sont pas capables de réparer les CPD de manière efficace; leur système de réparation n'étant pas en action. La présence des CPD provoque un blocage de la transcription menant les lymphocytes à entrer en apoptose. Ceci crée une baisse de l'activité et une baisse de présence des cellules T résultant en une immunosuppression (Han et al., 1998).

Les UVB sont également la cause de bris simple brin, leur proportion augmentant avec une hausse de la longueur d'onde utilisée, et provoquent des dommages aux bases tels les thymines glycols et les 8-oxo-guanines (Stewart et al., 1996). Puisque l'ADN est constamment en contact avec une variété de protéines, l'énergie des UVB peut favoriser des pontages protéines-ADN via des résidus cystéines (Peak and Peak, 1991). Les liens covalents entre ces deux entités sont retrouvés plus fréquemment dans la portion des UVB de haute longueur d'onde.

1.9 Les lésions causées à l'ADN par les ultraviolets de type A (320-400nm)

Les UVA se rendent à la surface de la Terre 20 fois plus que peuvent le faire les UVB (Frederick and Alberts, 1992), c'est-à-dire qu'ils constituent 90% de l'énergie solaire terrestre et ils pénètrent plus efficacement les couches basales de la peau. Ils se rendent jusqu'à l'épiderme où se situe l'initiation de la photocarcinogénèse. Alors que seulement 2% des UVB pénètrent le derme, jusqu'à 20% des UVA peuvent l'atteindre (Tyrrell, 1996) (voir figure 2). Les UVA sont considérés moins mutagéniques et moins carcinogènes que les UVB parce qu'il est nécessaire d'en avoir une beaucoup plus grande dose afin d'obtenir des mutations et pour induire des tumeurs (Berg et al., 1993; de Gruijl et al., 1993). Par contre, le spectre d'action des UV pour une induction de mélanomes, indique que la majorité des tumeurs est attribuable aux effets mutagéniques des longueurs d'ondes au-delà de 320 nm (Setlow et al., 1993). Les UVA sont donc les rayons solaires UV qui sont le moins bien absorbés par l'ADN. Les UVA et une faible proportion des UVB sont absorbés par des macromolécules dans la cellule tels que les chromophores: la riboflavine, la prophyrine, les quinones, la bilirubine (Rosenstein et al., 1983) ce qui rend leur effet génotoxique indirect par opposition aux UVB qui affectent directement l'ADN. L'énergie des UVA est donc transférée de ces chromophores à l'ADN par des intermédiaires réactifs oxygénés tels que l'oxygène singulet ou encore des radicaux oxygénés. Ces réactifs sont connus sous le nom d'espèces réactives oxygénées (ROS) (voir figure 11). Trois sortes de dommages sont majoritairement créés par les UVA soient i) des 8-oxo-7,8-dihydroguanines (8-O-G) (Devasagayam et al., 1991) ii) des bris simples brins, à des niveaux plus faibles que pour les 8-O-G cependant, soit 10 fois moins souvent (Pflaum et al., 1994) et iii) des dimères de pyrimidines (Matsunaga et al., 1991; Tyrrell, 1973). Ainsi, le taux de 8-O-G détecté dans les cellules de mammifère après une irradiation aux UVA est élevé, suggérant que les 8-O-G sont des lésions importantes suite à une irradiation (Hattori-Nakakuki et al., 1994).

Jusqu'à présent, le spectre de mutations des UVA purs n'est pas connu chez la levure. Un traitement aux UVA cause une proportion plus importante de réarrangement dans l'ADN (39%) par rapport aux mutations ponctuelles que le font les UVB (24%) chez des cellules humaines. Les mutations ponctuelles pour les UVB se produisent préférentiellement à des sites dipyrimidiques, mais aucun site préférentiel n'a été relevé pour les UVA. Une absence de mutations en tandem a été observée (Robert et al., 1996). Les mutations les plus communes sont G:C→A:T et beaucoup de mutations se produisent aux sites A:T pour les grandes longueurs d'onde. Chez les cellules de rongeur, la signature des UVA serait une transversion A:T→C:G (Drobetsky et al., 1995), observée plus particulièrement sur le brin non-transcrit contrairement à ce qui arrive avec les UVC (254nm) (Drobetsky et al., 1994). Ceci n'est pourtant pas le cas chez les cellules de rein humain (Robert et al., 1996) ou les cellules humaines TK-6¹.

Des études portant sur l'importance de la réparation par excision de nucléotides (NER) lors de radiations aux UVA ont conclu que celle-ci n'avait qu'une faible importance face à la réparation des dommages causés par cette longueur d'onde. En effet, des cellules déficientes en NER de patients atteints de Xeroderma pigmentosum ont une sensibilité semblable à leur souche parentale face aux UVA alors qu'elles sont beaucoup plus sensibles aux UVC (254nm) et UVB (Sato and Yoshikawa, 1992). En ce qui a trait aux défenses contre les dommages oxydatifs, notons que le niveau de glutathion (qui enraye l'action du H₂O₂), s'abaisse rapidement après une exposition aux rayons UVB et UVA (Connor and Wheeler, 1987). Ces rayons réduisent donc la défense des cellules contre les dommages oxydatifs. Par contre, d'autres moyens de défense sont stimulés par les UVA: l'induction du gène de l'hème oxygénase I, qui aide à la séquestration du fer en ferritine, qui va à l'encontre de la réaction de Fenton (voir figure 11 et section 1.11.1) (Applegate and Frenk, 1995; Vile and Tyrrell, 1993). Au contraire, les UVA peuvent augmenter la présence de fer disponible dans la cellule et ainsi contribuer à la formation de dommages oxydatifs. Les UVA déstabilisent les membranes lysosomiales causant un relâchement des enzymes protéolytiques qui vont dégrader la ferritine (Pourzand et al., 1999). La métallothionéine, protéine liant les ions métalliques et donc indirectement impliquée dans la séquestration des radicaux est induite par les UVC (254nm) et les UVA. L'induction de ce gène est corrélée avec la résistance à plusieurs agents mutagéniques. Des cellules de hamster ayant un plus grand taux de métallothionéine ont une plus grande résistance aux UVA (Dudek et al.,

¹ Léger et Drobetsky, manuscrit en préparation.

1993; Stein et al., 1989). En résumé, on peut donc conclure que les UVA ont un effet protecteur et aussi néfaste pour la cellule (Gilchrest and Eller, 1999).

1.9.1 Les 8-oxo-7,8-dihydroguanines

Les 8-oxo-7,8-dihydroguanines ou 8-oxo-guanines (forme tautomérique dominante) sont formées par l'ajout d'un groupement radical hydroxyl (OH[•]) sur le carbone 8 de la guanine (Nash et al., 1996). Ce changement de la guanine occasionne de mauvais appariements lors de la réplication de l'ADN. En effet la 8-O-G s'apparie plus facilement avec une adénine qu'avec une cytosine ou à tout le moins de façon égale (Michaels et al., 1992). Il en résulte donc, dans 50% des cas, une transversion G-C à T-A. Il survient alors des mutations permanentes dans le code génétique ce qui pourra entraîner un effet grave lors de l'expression génique (Demple and Harrison, 1994). Par contre, ce dommage ne cause pas un arrêt de la polymérase d'ADN chez les prokaryotes ou eukaryotes (Shibutani et al., 1991). La formation des 8-O-G par les UVC (254nm) ou les UVB est médiée par le radical anion superoxyde plutôt que par le radical hydroxyl (Wei et al., 1997). Les 8-O-G ne sont formées que sur une séquence d'ADN et non sur le nucléotide seul. De plus, le taux d'induction de 8-O-G par les courtes longueurs d'onde est proportionnel avec le contenu en A-T de l'ADN. Cependant, l'explication de l'importance du taux de A-T est encore inconnue (Wei et al., 1998).

1.9.2 Les bris simple brin

Les bris de brin occasionnés par les UVA peuvent provenir des sites alkali labiles qui vont générer des bris simple brin ou encore, des bris double brin (Peak and Peak, 1982).

1.9.3 Les dimères de pyrimidines

Les dimères de pyrimidines occasionnés par les UVA sont de même nature que ceux formés par les UVB ou les UVC (254nm) sauf qu'ils demandent un degré d'énergie 6 fois plus important que les UVC (254nm) pour un taux semblable de mutations (Tyrrell, 1973). Par contre, aucun photoproduit (6-4) n'est généré suite à une exposition aux UVA (Mori et al., 1988; Umlas et al., 1985)

1.10 La réparation de l'ADN

L'altération d'une base, si présente dans la séquence d'ADN à répliquer, peut occasionner du mésappariement. Ce changement dans le code génétique met en péril l'intégrité de l'information génétique. Plus une lésion est hautement mutagénique, plus la possibilité de modifier un gène d'importance est accrue et cette détérioration du matériel génétique provoquera la formation de protéine incomplète, voire inefficace ou encore oncogène. L'arrêt de la polymérase d'ADN ou ARN par les différents dommages est une autre implication que peuvent avoir les dommages à l'ADN. Ces arrêts peuvent inhiber le passage à travers les différentes phases du cycle cellulaire et ainsi causer la mort de la cellule. Etant donné les dangers que peuvent apporter les dommages, il est donc important que des enzymes spécialisées puissent les enlever.

1.10.1 La réparation des dimères de pyrimidines

1.10.1.1 La réparation par photoréactivation

Les CPD étant mutagéniques, la cellule a développé divers moyens pour réparer ces lésions. Tout d'abord, la photoréactivation enzymatique est un mécanisme utilisé chez plusieurs microorganismes ainsi que chez les eukaryotes supérieurs mais non chez les humains. Ce mécanisme agit en deux étapes soit i) la reconnaissance du dommage et sa fixation, ii) l'absorption d'un photon de la lumière visible et utilisation de l'énergie s'en dégageant pour convertir les CPD à leur forme monomérique en clivant les liens anormaux unissant les pyrimidines (Rupert, 1962; Sancar, 1990; Yasuhira and Yasui, 1992; Yasui et al., 1994). Afin de ne rien laisser au hasard, les enzymes font une analyse méthodique de l'ADN. Ceci est réalisée par une attraction électrostatique entre l'enzyme comme telle et l'ADN, conduite par un mouvement Brownien (Lloyd, 1998) comme c'est le cas pour l'endonucléase V du phage T4. En effet, cette enzyme va cliver à tous les sites de dimérisation entre des pyrimidines permettant à l'hôte du phage T4 de réparer le brin endommagé (Lloyd et al., 1980). Chez la bactérie *Micrococcus luteus*, deux homologues de l'endo V du phage T4 sont pourvus d'une activité glycosylase, servant à cliver la base du corps glycosylé et d'une fonction AP lyase pour sectionner l'ADN en 3' du site abasique sur les dimères de pyrimidines (Shiota and Nakayama, 1997). Un des homologues aurait 31% d'identité au niveau des acides aminés avec l'endonucléase III d'*E. coli*, enzyme ayant les propriétés de cliver également en 3' du site abasique dans l'ADN (Piersen et al., 1995). Chez la levure, *S. cerevisiae*, Phr1p possède une activité semblable à celle de la T4 endoV

(Hamilton et al., 1992; Lloyd, 1998; Sancar and Smith, 1989). Phr1p est une apoenzyme catalysant la réparation des dimères de pyrimidines de façon lumière dépendante. L'induction du gène est modulé par les UV ainsi que par différents agents dont les dommages ne sont pas réparés par l'enzyme elle-même par exemple: le 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), le *N*-méthyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG), le méthyle méthanesulfonate (MMS) ainsi que la bléomycine (Sebastian et al., 1990). Chez le champignon filamenteux *Neurospora crassa*, le gène *mus-18* code pour une protéine qui, comme l'endo V, coupe aux sites de CPD, mais aussi aux 6-4PP (Yajima et al.,). L'action de la photolyase, chez *E. coli* et *S. cerevisiae*, peut accentuer la reconnaissance des lésions par la réparation par excision de nucléotides (voir section 1.10.1.2). Ceci pourrait constituer une protéine accessoire au NER en ce qui concerne l'excision des dommages causés par les UV (Sancar et al., 1984; Sancar and Smith, 1989). Par contre, lorsque la photolyase s'associe à d'autres lésions déformant l'ADN comme celles faites par le cisplatine, le *N*-méthyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, le 4-nitroquinoline 1-oxide ou la moutarde d'azote (HN₂), celle-ci empêche l'action du NER et accroît la sensibilité des cellules face à ces agents (Fox et al., 1994).

1.10.1.2 La réparation par excision de nucléotides

Pour accompagner la réparation médiée par les photolyases, une variété d'organismes de la bactérie jusqu'à l'humain vont exciser les dimères de pyrimidines par un mécanisme appelé réparation par excision de nucléotides global (NER) (par opposition à la réparation liée à la transcription). Cette voie de réparation sera des plus importantes en ce qui concerne les lésions à l'ADN formant des distorsions dans l'hélice ou encore ayant un aspect encombrant comme celles induites lors d'exposition aux UV, les dommages chimiques fait par le cisplatine ainsi que les adduits de N-acétyl-acetoxyaminofluorène (AAF). Par ailleurs, des études ont démontré que des lésions non-encombrantes (purines méthylées ou bases altérées) pouvait être un substrat, bien que peut idéal, pour le NER (Huang et al., 1994). L'élément majeur dans cette forme de réparation est l'incision de l'ADN de part et d'autre du dommage, le confinant dans un fragment de 12-13 nucléotides chez les prokaryotes (Sancar and Rupp, 1983; Yeung et al., 1983) et de 24 à 32 nucléotides de long chez les eukaryotes. La longueur du fragment dépend du type de dommage ainsi que du contexte séquentiel (Huang et al., 1992; Moggs et al., 1996). Ensuite, il y aura synthèse du brin remplaçant le fragment excisé et ligation du tout. Le NER, contrairement à

la réparation par excision de bases (BER), nécessite l'action concertée de plusieurs protéines, lesquelles interagissent avec d'autres membres de complexes de réparation (voir figure 6).

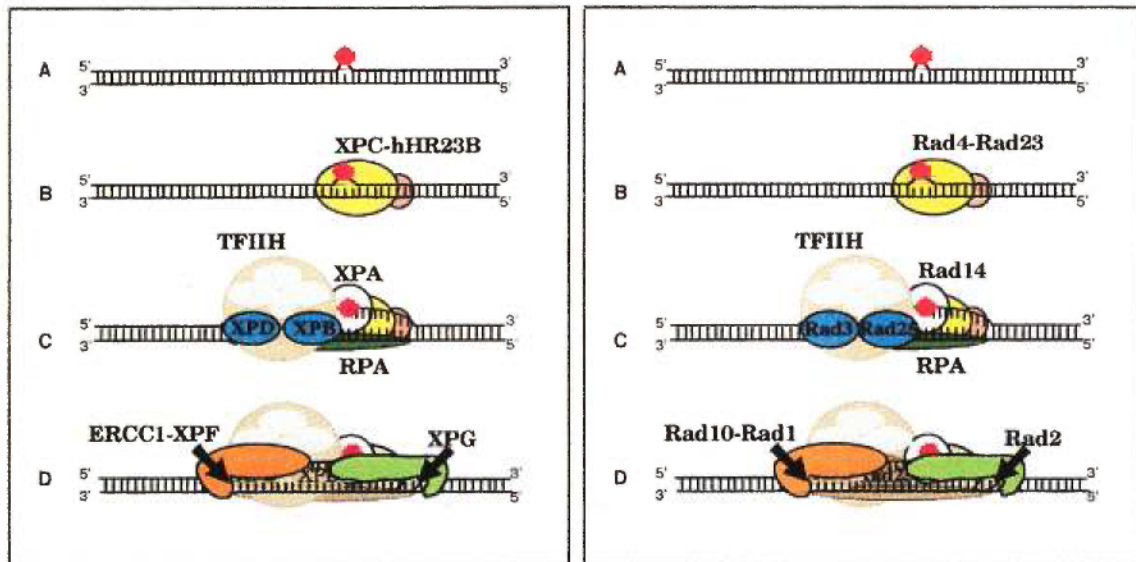


Figure 6: Réparation par excision de nucléotides (NER) chez l'humain et la levure. On peut voir en A l'apposition du dommage dans l'hélice d'ADN. En B, il y a identification du dommage par les enzymes de reconnaissance. En C vient l'ouverture du brin et la formation de la "bulle". En D, on nous montre l'incision en 5' et en 3'. Figure tirée de Araujo et Wood, 1999.

De façon un peu plus détaillée, une fois le dommage inséré dans l'hélice d'ADN, il y aura un complexe protéique dont fait partie les protéines RPA et Rad14p chez la levure (RPA et XPA chez l'humain), qui reconnaîtra la lésion. L'affinité de l'enzyme de reconnaissance est corrélée avec l'étendue de la distorsion de l'hélice d'ADN (Asahina et al., 1994; Jones and Wood, 1993; Robins et al., 1991). Associées à ce groupe de reconnaissance, d'autres protéines telles que des hélicases: Rad4p et Rad23p (XPC-hHR23B chez l'humain) et TFIIH s'activeront à ouvrir localement la matrice d'ADN autour du dommage localisé (Svejstrup et al., 1996). D'une manière ATP-dépendante, il y aura formation d'une plus large structure entrouverte, d'environ 25 paires de bases isolant ainsi le dommage (Evans et al., 1997). Ensuite, le brin endommagé sera incisé en 3' par Rad2p (XPG chez l'humain) et ensuite en 5' de la lésion par Rad10p-Rad1p (ERCC1-XPF chez

l'humain). Ces nucléases ont la spécificité de couper l'ADN à la bordure de l'ADN simple-brin et du duplex d'ADN lorsque l'ADN simple-brin se détache de son complémentaire de manière 5' vers 3' en partance du double-brin. Elles agissent donc selon un intermédiaire de "bulle" durant la réparation. Même si les deux coupures sont faites pratiquement simultanément, il apparaît que l'incision en 3' serait en fait la première à être effectuée (Mu et al., 1996; O'Donovan et al., 1994). Enfin, le fragment excisé se liera à un des composants du complexe (Mu et al., 1996) et sera remplacé dans une réaction de synthèse d'ADN par la polymérase d'ADN δ ou encore par l'holoenzyme ϵ (Wood and Shivhi, 1997) à partir d'une extrémité 3'-OH laissé par l'enzyme coupant en 5' du dommage (Sijbers et al., 1996). Le processus se complètera par la ligation du nouveau segment par une ADN ligase à l'extrémité 5'. L'ordre d'incision dans le NER n'est pas nécessairement strict puisqu'on voit, dans des extraits de cellules humaines proficientes pour le NER, des incisions 3' ou encore 5' non-couplées avec leur symétrique respective. De plus, il est plus fréquent d'observer des coupures non-couplées en 3' qu'en 5' (Mu et al., 1996; Sijbers et al., 1996). Généralement, l'incision en 3' se fera entre 2 et 9 nucléotides en aval du dommage tandis que l'incision en 5' sera 16 à 25 nucléotides en amont correspondant à la bordure du complexe ouvert. La position exacte des incisions dépend en partie du type de lésion à réparer (Matsunaga et al., 1995; Moggs et al., 1996). Le tout faisant un fragment excisé "modèle" de 26-27 dans chaque cas (Moggs et al., 1996). Les enzymes de différents organismes participant au NER sont citées au tableau I.

Tableau I: Comparaison des enzymes du NER à travers l'évolution selon Wood, 1997.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>
Reconnaissance de la lésion	<i>UvrA et UvrB</i>	<i>RPA</i> <i>RAD 14</i> <i>RAD 4</i> <i>RAD 23</i>	<i>RPA</i> <i>XPA</i> <i>XPC</i> <i>hHR23B</i>
Ouverture des brins de l'ADN		<i>RAD 25</i> <i>RAD 3</i>	<i>TFIIH-XPB</i> <i>TFIIH-XPD</i>
Incision en 5'	<i>UvrC</i>	<i>RAD 10</i> <i>RAD 1</i>	<i>ERCC1</i> <i>XPF</i>
Incision en 3'	<i>UvrB</i>	<i>RAD 2</i>	<i>XPG</i>
Excision/Réparation	<i>UvrD</i>	<i>POL30</i> <i>CDC44</i>	<i>PCNA</i> <i>RFC</i>
	ADNpol I	ADN pol δ/ϵ	ADN pol δ/ϵ
	ADN ligase I	<i>CDC9</i>	ADN ligase I

1.10.1.3 La réparation liée à la transcription

Les dimères de pyrimidines peuvent également être réparés par un mode plus spécialisé du NER soit la réparation couplée à la transcription (TCR). Cette voie de réparation enlève les adduits de l'ADN d'une façon plus rapide sur le brin transcrit que sur le brin non-transcrit. Conséquemment, la réparation des CPD se fait beaucoup plus rapidement par cette voie, puisque les CPD, de façon générale sont des lésions qui sont réparées lentement par le NER-global (Mellon and Hanawalt, 1989; Mellon et al., 1987). Chez la levure, l'enzyme Rad26p participe à la réparation couplée à la transcription (Tijsterman et al., 1997). Le mutant de délétion *rad26* n'est pas sensible aux ultraviolets, mais la protéine est nécessaire pour l'élongation de la transcription par la polymérase d'ARN. L'équipe de Waters (2000) suggère que lorsque la transcription débute, Rad26 est nécessaire au TCR peut-être par un échange entre le complexe de transcription "holo"-

TFIIH et le complexe de réparation "core"-TFIIH (contenant 5 sous-unités dont Rad3, TFB1 et Ssl1) (Teng and Waters, 2000).

Les CPD peuvent être réparés par deux types de mécanisme préférentiel. Un premier type serait que la réparation se cible parmi l'ADN actif, soit déroulé dans une structure chromatinienne ouverte (Venema et al., 1992). Le deuxième type implique un très grand rapprochement entre la réparation et l'ARN polymérase II conduite par la transcription. Cette transcription couplée à la réparation agit sur le brin transcrit et apparaît comme ayant préséance pour la réparation des gènes actifs (Mullenders et al., 1997). L'équipe de Jean-Marc Égly est du même avis puisqu'ils ont découvert que les dommages causés par les UV forment une structure tridimensionnelle similaire à celle adoptée par la boîte TATA des gènes transcrits (Vichi et al., 1997). Ce leurre séquestrerait donc les éléments TFIIH et TBP (facteur de transcription et "TATA binding protein") de leur cible promotrice naturelle. Ceci expliquerait la baisse de transcription observée dans des cellules après l'irradiation. Si les TBP sont localisées sur les dommages laissés par les UV, il y a moins de complexes de pré-initiation. Le TFIIH non-recruté par la TBP peut alors aller s'associer avec des protéines de réparation. D'un autre côté, TBP pourrait être une constituante du complexe de reconnaissance des lésions avec XPA et RPA toutes deux associées à la reconnaissance des dommages dans le NER humain et ainsi recruterait TFIIH (Vichi et al., 1997). Chez les cellules de mammifères, la réparation couplée à la transcription a lieu en l'absence de l'enzyme de reconnaissance XPC, mais requiert les autres composantes du NER (RPA, XPA, XPB, XPD, TFIIH, hHR23B, ERCC1-XPF, XPG, RFC, PCNA et polymérase d'ADN). Cette réparation, chez la levure comme chez l'humain prendrait naissance lorsque la polymérase d'ARN serait bloquée au site de la lésion (Hanawalt, 1994), ce qui en fait un excellent détecteur de dommages à l'ADN (Donahue et al., 1994; Hanawalt and Mellon, 1993). Par ailleurs, certains dommages oxydatifs comme les thymines glycols peuvent être réparés par cette voie (voir section 1.10.4.4) (Leadon and Cooper, 1993).

1.10.1.4 L'état de condensation de l'ADN

La présence des nucléosomes affecte l'accessibilité des lésions par le système de réparation. La réparation des lésions sur le brin non-transcrit est plus rapide dans des régions déroulées que dans la chromatine condensée. D'un autre côté, la réparation couplée à la transcription semble indépendante de l'organisation de la chromatine *in vivo* car s'il y a transcription, l'ADN est forcément déroulé (Wellinger and Thoma, 1997). Cependant, sur

de l'ADN enroulé irradié on retrouve une périodicité des CPD égale à 10,3 pb, consistant avec la longueur à laquelle l'ADN est compacté (Gale et al., 1987; Gale and Smerdon, 1988; Pehrson, 1989). En ce qui concerne les photoproduits 6-4, aucune périodicité n'est par contre remarquée dans les mêmes conditions (Gale and Smerdon, 1990; Mitchell et al., 1990). Par contre, la reconstitution des nucléosomes est influencée par la présence des CPD et cet effet n'est perceptible qu'avec une formation *de novo* des nucléosomes (Suquet and Smerdon, 1993).

L'intégrité de la chromatine est indispensable à la bonne réparation des dommages causés par les UV. En effet, une levure délétée dans l'opéron *caf-I*, *cac-1*, *cac-2* ou *cac-3*; les 3 sous-unités du "chromatin assembly factor-I", démontre une plus grande sensibilité face aux UV comparativement à sa souche sauvage (Kaufman et al., 1997). Il y a deux modèles par lesquels on peut lier le Caf-I à la réparation d'ADN. Premièrement, Caf-I peut agir comme facteur auxiliaire à la réparation post-réplivative en compagnie de Rad6, puisque qu'un double mutant *cac1Δ rad6Δ* n'est pas plus sensible aux UV qu'un simple mutant. Une deuxième possibilité est que l'assemblage des nucléosomes, médié par Caf-I, prévient l'addition de certains dommages sur l'ADN compacté, ce qui explique la sensibilité d'une souche délétée dans les gènes *CAC*. Les hypothèses citées ne sont pas mutuellement exclusives (Game and Kaufman, 1999).

1.10.2 La réparation des photoproduits (6-4)

Les photoproduits (6-4) sont réparés plus rapidement que les dimères de pyrimidines (Mitchell and Nairn, 1989), probablement à cause de la différence d'affinité des senseurs de dommages XPC-hHR23B chez l'humain (Sugasawa et al., 1998). Ces lésions ne sont que peu significativement réparées par le TCR (van Hoffen et al., 1995). Les CPD quant à eux, requièrent la présence de facteurs liant l'ADN endommagé telle que la DNA damage binding protein, DDB, afin d'être mieux reconnus par les détecteurs de dommages du NER global (Hwang et al., 1999).

Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, il existe deux mécanismes par lesquels les CPD et les photoproduits (6-4) sont réparés. Le traditionnel NER avec les homologues enzymatiques de *S. pombe* et en second, une endonucléase spécifique aux dommages UV nommée Uvde. Celle-ci s'apparente à l'endonucléase retrouvée chez le phage T4. Elle incise l'ADN immédiatement en 5' de la lésion. Les évidences génétiques veulent que l'incision en 3' du dommage serait fait par Rad2p, dont l'homologue chez *S. cerevisiae* est

Rad27, qui est une endonucléase structure-spécifique capable de couper l'ADN double brins contenant un rabat en 5' (Yasui and McCready, 1998).

1.10.3 Déficience de la voie de réparation par excision de nucléotide

Lors des déficiences dans la réparation par excision de nucléotides, plusieurs sortes de syndromes peuvent survenir. Par exemple, il peut y avoir le Xeroderma pigmentosum (XP) dont les patients sont très sensibles au soleil, ont un taux de cancer de la peau d'une grande incidence et ont des détériorations oculaires. Il existe 7 groupes de complémentation génétique soit 7 gènes pouvant être touchés pour donner la même maladie, de XP-A à XP-G avec une forme variante XP-V; chacune de ces protéines sont des unités de la machinerie du NER, sauf en ce qui concerne XP-V. Également, des lacunes au niveau du NER peuvent générer des maladies comme le syndrome de Cockayne (CS) ou encore la trichothiodystrophie (TTD) (Lehmann and Carr, 1995). Les patients atteints du CS sont sensibles aux rayons solaires et ont en plus des désordres reliés au développement et au système neurologique. Ils sont déficients dans la réparation couplée à la transcription et ils ont des défauts au niveau de la transcription basale également. Ils existent deux groupes de complémentations soit CS-A et CS-B (chez la levure Rad26p) (Bohr et al., 1998). Les gens atteints de TTD sont sensibles aux effets solaires sans pour autant avoir un potentiel à développer des tumeurs. Ils ont les cheveux secs, cassants et clairsemés (Stary and Sarasin, 1996). Des individus atteints de TTD portent une mutation dans le gène XPD/ERCC2. Il semblerait que des mutations dans le gène XPD peuvent affecter la voie de recrutement de la réparation par excision, donnant lieu au Xeroderma pigmentosum de type D ou affecter la transcription de l'ADN et donnant lieu à la trichothiodystrophie (Woods, 1998).

1.10.4 La réparation des espèces réactives oxygénées

1.10.4.1 La réparation par excision de base de type "short patch"

De manière générale, la cellule protège son génome des attaques hydroxyles par un mécanisme d'excision de base (BER) (voir figure 7). Nous verrons plus loin l'excision des 8-O-G et des thymines glycols en particulier avec les enzymes spécifiques pour de tels dommages. Le BER est requis lorsqu'il y a des ajouts non-conformes aux bases tel la méthylation, l'oxydation, la réduction ou encore la fragmentation des bases. Ainsi, le BER s'occupe des lésions qui n'altèrent pas la conformation normale de l'ADN. L'étape

principale du BER est celle de l'excision de la base endommagée par une ADN glycosylase. Cette enzyme hydrolysera le lien reliant la base au sucre créant ainsi un site apurinique ou apyrimidique (AP). Ce site AP est pris en charge par une AP endonucléase, soit Endo IV chez *E. coli* ou encore Apn1p chez *S. cerevisiae* qui clivera le lien phosphodiester en amont du site AP (donc en 5') ou encore par une AP lyase qui elle, séparera l'ADN en 3' du site AP. L'AP lyase bactérienne est Exo III, chez *S. cerevisiae* on la nomme Apn2p et l'humain possède HAP1 (APE/Ref1) (Johnson et al., 1998). L'action de l'AP endonucléase génère une extrémité 3' hydroxyle ainsi qu'une extrémité 5' déoxyribose-phosphate (Barzilay and Hickson, 1995; Demple and Harrison, 1994). Afin de permettre le travail de la polymérase d'ADN β , le déoxyribose-phosphate sera éliminé par une 5'-déoxyribose-phosphodiesterase. Une fois le bon nucléotide inséré à la place du site AP, les extrémités seront rejointes par une ADN ligase (Matsumoto and Kim, 1995; Singhal et al., 1995).

Lorsque le site AP est clivé par une AP lyase, la scission crée une extrémité 5'-phosphate et un produit aldéhyde insaturé en 3' ((4R)-4-hydroxy-*trans*-2-pental) (Kim and Linn, 1988; Laspia and Wallace, 1988; Mazumder et al., 1991). Afin d'éliminer cet aldéhyde bloquant la réplication, la cellule fera appel à une activité 3'-phosphodiesterase (β -élimination) retrouvée chez les AP endonucléases (Johnson and Demple, 1988b; Levin et al., 1988; Sander and Huang, 1995), pour retrouver une extrémité 3'-OH pouvant servir de matrice à la polymérase d'ADN (Demple and Harrison, 1994). Indirectement, l'aldéhyde peut être exclus par une élimination dite δ ce qui libère le corps glycosylé de l'aldéhyde tout en laissant une extrémité 3'-phosphate qui pourra quant à elle se transformer en 3'-OH par une 3'-phosphatase, laissant le passage à la polymérase d'ADN β .

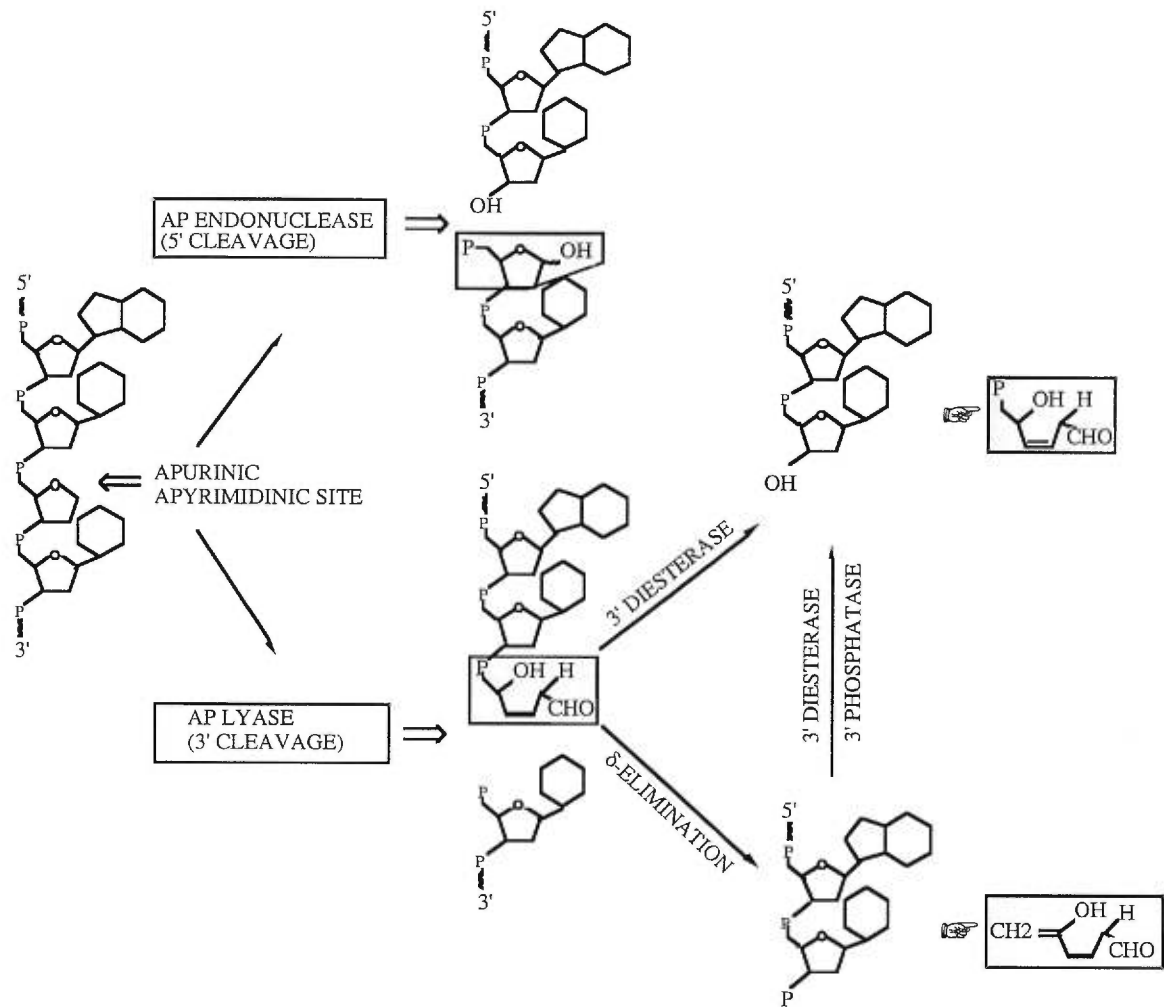


Figure 7: Réparation par excision de bases (BER). Une base modifiée est identifiée par une glycosylase et est enlevée du corps d'ADN. Une AP endonucléase ou encore une AP lyase vient ensuite inciser le brin contenant le site AP. Les extrémités des brins sont fixées pour créer un substrat convenable pour la polymérase d'ADN afin d'insérer un nouveau nucléotide et liquer le brin. Figure tirée de Masson, 1997.

1.10.4.2 La réparation par excision de bases de type "long patch"

Un nouveau système de réparation sous le même principe que le BER "short patch" a été démontré chez *E. coli*, *Xenopus laevis* ainsi que chez l'humain, mais il se distingue par quelques différences (Dianov and Lindahl, 1994; Frosina et al., 1996; Matsumoto et al., 1994; Nealon et al., 1996). Il s'agit d'un BER qui serait dépendant du "proliferating cell nuclear antigen" (PCNA) et qui impliquerait le remplacement d'un court oligonucléotide de 6-13

site AP (Frosina et al., 1996; Gary et al., 1999). La réparation d'un site AP par le BER PCNA-dépendant implique la formation d'un rabat d'ADN. Ce rabat serait composé d'un ADN double brin et d'un morceau d'ADN, déplacé, simple brin (Frosina et al., 1996). Le rabat en question serait l'extrémité 5'-phosphate qui est enlevé dans un bloc en la présence d'un oligonucléotide par une endonucléase structure-spécifique. Par la suite, l'ADN est coupé par une endonucléase au site d'incision. Chez *E. coli*, l'activité endonucléase structure-spécifique est fournie par la polymérase d'ADN I et chez l'humain, par la DNase IV (FEN-1) (DeMott et al., 1996; Dianov and Lindahl, 1994; Frosina et al., 1996; Lyamichev et al., 1993; Matsumoto et al., 1994). Cette dernière est membre de la famille des nucléases Rad2p de levure (Harrington and Lieber, 1994) et son pendant chez *S. cerevisiae* est Rad27p (Reagan et al., 1995) ou encore la protéine Rth1p (Johnson et al., 1995). La coupure par l'endonucléase est activée par une jonction d'un duplex d'ADN et d'un ADN non-pairé (Lieber, 1997) et stimulée par la présence de PCNA (Wu et al., 1996). Tout en étant relié au PCNA, le BER "long-patch" peut lui aussi se subdiviser en deux catégories soit: i) stimulé par PCNA, la synthèse d'ADN étant dirigée par la polymérase d'ADN β et ii) dépendant de PCNA et la synthèse d'ADN étant dirigée par les polymérases d'ADN δ/ϵ (voir figure 8) (Wilson and Thompson, 1997).

Ce qui pousse la cellule à aller vers le BER "short patch" ou BER "long patch" est en fait le type de glycosylase d'ADN qui vient exciser le dommage (Fortini et al., 1999). En effet, lorsque les bases endommagées sont oxydées (comme le 8-O-G) ou encore réduites, la cellule aura tendance à préférer le "long patch" afin de réparer son ADN (Klungland and Lindahl, 1997).

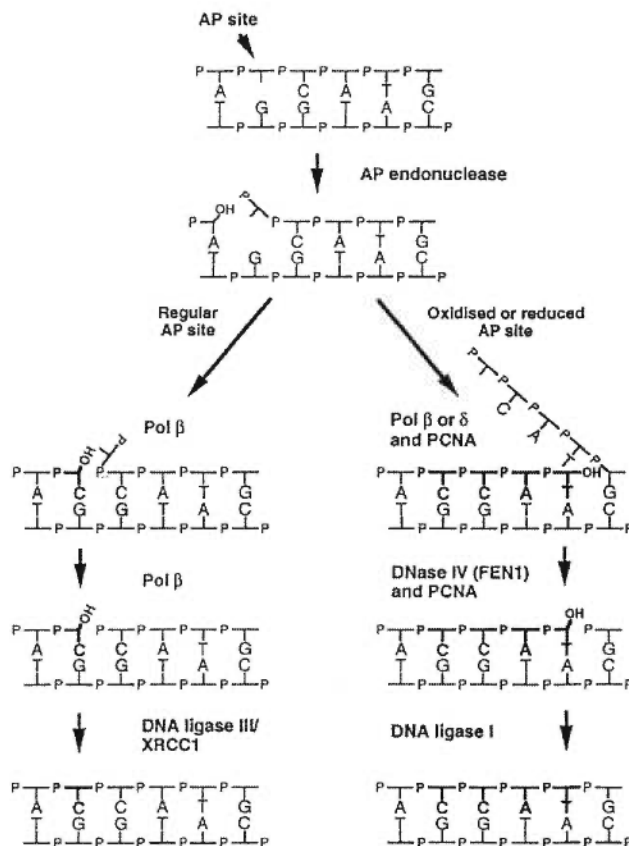


Figure 8: Comparaison entre le BER de type “short patch” et “long patch”. La section de gauche montre le BER insérant un seul nucléotide et la section de droite, le BER insérant un oligonucléotide. Les sites AP sont généralement réparés par la première méthode, mais les bases oxydées ou réduites sont réfractaires à cette réparation et sont réparées par le “long patch”. Figure tirée de Klungland and Lindahl, 1997.

1.10.4.3 La réparation des 8-oxo-guanines

Dans le cas précis de la 8-O-G, la cellule possède une glycosylase spécifique qui reconnaît la lésion. Chez *E. coli*, le gène *mutM* (ou *fpg*) sert de glycosylase reconnaissant particulièrement les guanines oxydées dans le corps d’ADN. Celle-ci sera alors excisée et la polymérase pourra incorporer une nouvelle guanine intacte. Également, *E. coli*, possède deux autres enzymes protégeant la cellule contre l’effet nocif des 8-O-G. Il s’agit des gènes *mutY* et *mutT*. Le gène *mutY* encode pour une glycosylase-adénine qui va cliver l’adénine lorsqu’elle sera pairée avec une guanine oxydée. Enfin, le gène *mutT* traduit une nucléoside triphosphatase qui hydrolyse le 8-O-GTP en 8-O-GMP ce qui a pour effet de l’éliminer du lot de nucléoside

disponible pour la synthèse d'ADN. La bactérie élimine de cette façon les risques de mutation causés par la 8-O-G (Cunningham, 1996). Le groupe de Schellhorn (1996) a démontré qu'en l'absence de l'enzyme glycosylase Fapy, i) *E. coli* éprouve une sensibilité accrue face aux UVA-UVB par rapport à sa souche sauvage ce qui n'est pas le cas face aux UVC (254nm) (Shennan et al., 1996) ii) le mutant *fpg* avait une prédominance de transversion G:C→T:A par rapport à la souche sauvage ce qui indique que ces mutations sont excisées par cette enzyme (Palmer et al., 1997). Fait à noter que ces résultats n'ont pu être reproduits dans notre laboratoire puisque qu'une souche déficiente en *fpg* réagit de la même façon que sa souche parentale face à des rayons UVA purs².

Chez la levure, une enzyme majeure semble être requise pour l'excision des 8-O-G. Il s'agit de la glycosylase/AP lyase Ogg1p (8-oxoguanine glycosylase), qui peut également exciser les résidus Me-Fapy-G (2,6-diamino-4-hydroxy-formamidopyrimidine, ouverture du cycle de la guanine) (Auffret van der Kemp et al., 1996; Nash et al., 1996). Celle-ci a une spécificité de clivage comme suit: 8-O-G:C > 8-O-G:T >> 8-O-G:G > 8-O-G:A. Une autre glycosylase (Ogg2p) possède une spécificité plus accrue pour la guanine oxydée pairée avec une purine. La levure posséderait donc 2 enzymes pour protéger son matériel génétique contre les 8-O-G, chacune ayant son rôle distinct dans l'excision de la guanine oxydée (Auffret van der Kemp et al., 1996; Hazrat et al., 1998; Nash et al., 1996). Il existe également un homologue de la glycosylase 8-O-G chez l'humain en la présence du gène *hOGGI* (Radicella et al., 1997). La présence de la même fonction enzymatique démontre que les systèmes de réparation sont bien conservés de la bactérie à l'humain et ce, pour la protection du génome envers les radicaux hydroxyls, en particulier pour les 8-O-G.

1.10.4.4 La réparation des thymines-glycols

Il existe également une glycosylase particulière qui reconnaît ce genre de lésion. Il s'agit de la thymine-glycol-DNA-glycosylase, aussi appelé endonucléase III, codée par le gène *nth*, chez *E. coli* (Radman, 1976). Chez la levure *S. cerevisiae*, on retrouve deux homologues ayant une affinité pour la Tg soit les gènes *NTG1* et *NTG2* pour "eNdonuclease Three-like Glycosylase" (Senturker et al., 1998). Chez l'humain, l'homologue se nomme *hNTH*. L'élimination de la base endommagée se fera par une activité glycosylase/AP lyase (Boiteux, 1993; Demple and Harrison, 1994). Cependant, l'équipe de Leadon et al. (1995) a démontré que les thymines glycols, chez la levure *S. cerevisiae*, sont réparées plus rapidement sur le brin transcrit par rapport au brin non-transcrit, ce qui laisserait supposer la participation de la

² Brodeur, Drobetsky et Ramotar, résultats non publiés

réparation couplée à la transcription (TCR) dans l'élimination de ce dommage (Leadon et al., 1995). Par contre, une souche délétée en *rad1*, gène requis pour la TCR ne reflète pas de diminution du taux de réparation des thymines glycols. Aussi, les auteurs concluent que la réparation des thymines glycols était majoritairement faite par l'ADN glycosylase et non par la TCR (Leadon et al., 1995). La comparaison des enzymes impliquées dans le BER, au fil de l'évolution est présentée au tableau II.

Tableau II: Comparaison des enzymes du "short patch" BER à travers l'évolution

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>
Glycosylase			
8-oxo-guanine	Fpg (<i>mutM</i>)	<i>OGG1</i>	<i>hOGG1</i>
Thymine glycol	EndoIII (<i>nth</i>)	<i>NTG1, NTG2</i>	<i>hNTH</i>
AP endonucléase	ExoIII (<i>xth</i>)	<i>APN2</i>	<i>HAP1 (APE/Ref1)</i>
	EndoIV (<i>nfo</i>)	<i>APN1</i>	-
AP lyase	EndoIII (<i>nth</i>)	<i>NTG1, NTG2</i>	<i>hNTH</i>

1.10.5 D'une voie de réparation à l'autre

Les dommages oxydatifs sont réparés d'une façon prépondérante par le BER, mais il y a également des lésions oxydatives qui bloquent la polymérase d'ADN et ainsi bloquent l'élongation de la transcription. Ces lésions, bien qu'oxydatives, seront prises en charge par la réparation couplée à la transcription, qui on le sait est du NER détourné. Ce lien indique qu'une polymérase bloquée est un substrat pour de multiples voies de réparation. Par ailleurs, on pourrait résumer les fonctions du NER comme suit: il joue un rôle majeur dans la réparation des lésions encombrantes qui ne sont pas des substrats pour le BER et il a un rôle de soutien pour le BER si celui-ci est débordé par la charge de travail. Si l'un des systèmes vient à faire défaut, d'autres systèmes compensent la perte de la fonction de réparation. En fait, les fonctions de support exercées par le NER lorsque les autres voies de réparation sont à pleine capacité, sont cruciales pour les organismes. Cependant, la réciproque n'est pas toujours applicable; la capacité des autres voies de réparation à compenser pour un NER déficient ou débordé dépend souvent du type de lésion rencontré. Dans certains cas, avec des types de lésions précis (pour des CPD (Yap and Kreuzer, 1991) ou pour les dommages oxydatifs (Brennan et al., 1994)), la recombinaison peut constituer un mécanisme de tolérance des

dommages. On parle de tolérance puisque le dommage persiste dans le génome. Cette voie d'évitement permet à la cellule de progresser dans le cycle cellulaire et le dommage demeurant devra être excisé selon le mode de réparation favorable (Swanson et al., 1999). Pour quelques lésions, le blocage de la polymérase d'ADN ne sera assez long pour que la réparation s'effectue et il y aura évitement du dit dommage par un "bypass" (Friedberg et al., 1995). Chez la levure, *S. cerevisiae*, on parle de la polymérase ζ ou η . En ce qui concerne les dommages créés par les UV, les CPD sont des lésions plus faciles à éviter que les 4-6PP (Carty et al., 1996). Encore une fois, la cellule sera alors capable de progresser dans le cycle cellulaire, mais son taux de mutation s'élèvera également. L'existence de multiples voies de réparation et de voies d'évitement de dommages impliquent à la fois la forte incidence des dommages à l'ADN ainsi que l'importance que la cellule accorde au fait de traiter ces dommages de façon efficace et ce, par de multiples voies (voir figure 9) (Swanson et al., 1999).

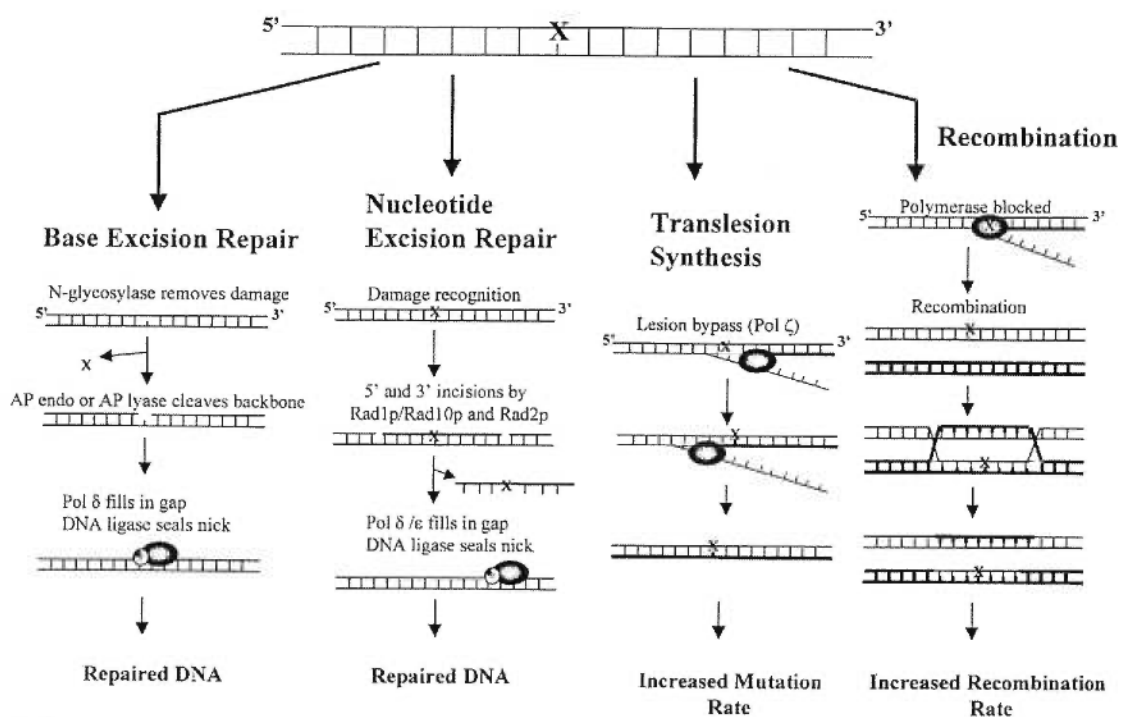


Figure 9: Chevauchement des voies de réparation pour une base endommagée chez *S. cerevisiae*. Le X représente un dommage à la base qui peut être reconnu et excisé par le BER ou le NER, pouvant être esquivé par la polymérase ζ ou qui bloque la réplication laissant la recombinaison faire son oeuvre. Le taux de réparation par chaque voie dépend du génotype des gènes de réparation possédés par chaque souche. Figure tirée de Swanson et al., 1999.

1.10.6 Les bris simple brin

Les bris simple brin peuvent être réparés par une simple ligation des bouts, ce que l'on appelle le "direct rejoining". Elle est exécutée par une DNA ligase dans un mécanisme impliquant la jonction enzymatique de bouts coupés intacts et non-endommagés. L'autre mécanisme ayant prédominance pour la réparation des bris simple brin est le BER car les bris de brin génèrent souvent des extrémités 3'-phosphoglycolate incompatibles avec une jonction enzymatique. Une enzyme du BER possédant une activité 3'-phosphodiesterase est alors requise pour transformer le bout en 3'-OH (Johnson and Demple, 1988b; Levin et al., 1988; Sander and Huang, 1995).

1.10.7 Les bris double brin

Les bris double brin sont une forme de dommage qui est réparé principalement par la recombinaison homologue chez la levure et aussi par un processus appelé "nonhomologous DNA end joining (NHEJ) lorsque les mécanismes de recombinaison sont déficients. Un bris double brin qui ne serait pas pris en considération pourrait dégénérer en fragmentation, perte ou translocation dans les chromosomes (Kanaar et al., 1998). La réparation des bris double brins se fait par la famille de protéines reliées au groupe épistatique de Rad52p soit: Rad50p, Rad51p, Rad52p, Rad54p, Rad55p, Rad57p, Rad59p, Mre11p et Xrs2p. Comme le montre la figure 10, la première étape de la recombinaison est la reconnaissance du bris double brin par un complexe composé des protéines Rad50p, Xrs2p et Mer11p. Celles-ci possèdent une activité endo- ou exonucléasique (selon les données *in vitro* ou *in vivo*) et résectent les cassures double brin pour former des extrémités 3' protubérantes d'environ 600 bases en moyenne. Le complexe de recombinaison (Rad51p, Rad52p, Rad54p, Rad55p, Rad57p et RP-A) qui ont une affinité pour les régions simple brin dans l'ADN, se fixe sur les extrémités 3' protubérantes, procèdent la localisation de la séquence identique et à l'invasion d'un duplex intact. Cette invasion provoquera la formation de la jonction de Holliday et sera déplacée (d'où le terme "branch migration") par un complexe d'enzymes (inconnu jusqu'à présent chez la levure). Il y aura donc échange des brins entre le brin homologue endommagé et non-endommagé. Une polymérase d'ADN et une ligase s'occuperont ensuite de resynthétiser l'ADN pour préserver l'information génétique. Une fois la synthèse réussie, la jonction de Holliday, sera coupée par une résolvasse, laissant deux duplex d'ADN non-endommagés (Kanaar et al., 1998).

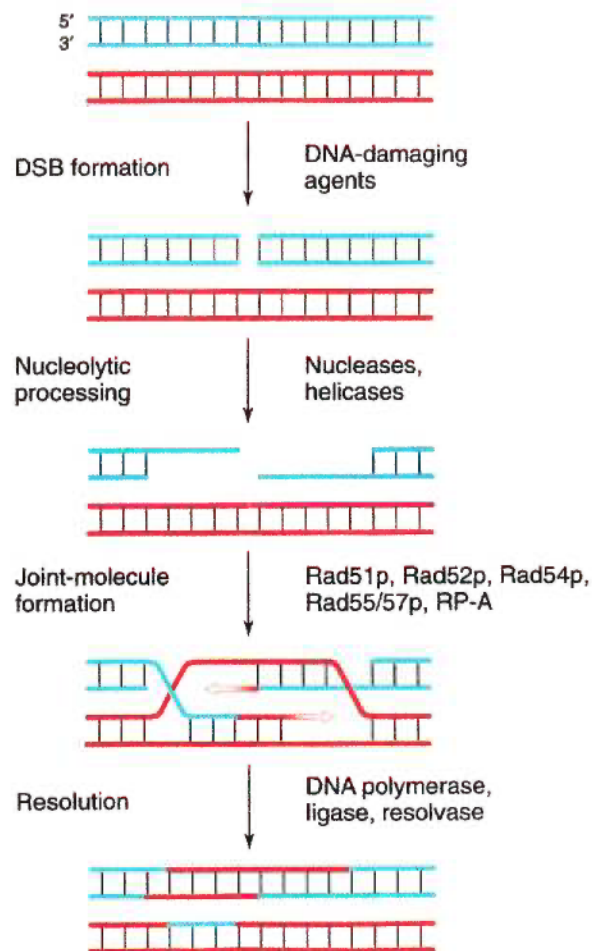


Figure 10: Modèle illustrant la recombinaison homologue chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le brin d'ADN est digéré de 5' en 3' afin de laisser une extrémité 3' protubérante. Ensuite, le complexe de recombinaison voit à l'échange des brins puis il y a synthèse de l'ADN. La jonction de Holliday est défaite par une résolvasse. Figure tirée de Kanaar et al., 1998.

1.11 La réponse cellulaire aux divers agents

En plus d'induire des enzymes de réparation de l'ADN, la cellule fait face aux ROS en enclenchant d'autres types de processus n'ayant pas toujours un lien avec la réparation des dommages. En effet, la cellule répondra par l'induction de gènes poussant l'apparition de polypeptides plus ou moins reliés avec le type d'agression. Ces inductions pourront faire répondre la cellule de manière telle qu'il sera, dans certains cas, hasardeux pour elle

d'accomplir ses tâches (division, réplication, défense). Nous verrons dans la section suivante quelles peuvent être les réponses données suite à un stress oxydant.

1.11.1 La régulation des gènes par le stress oxydant

La cellule est confrontée à plusieurs sources d'espèces réactives oxygénées de source exogène ou endogène. L'origine externe des ROS peut provenir des chocs thermiques, des radiations ionisantes, des UVA ou encore par la présence de certaines drogues, par exemple le ménadione ou le paraquat, dans l'environnement (Girard and Boiteux, 1997). En ce qui concerne les foyers internes de ROS, notons la présence de peroxyde d'hydrogène, l'activation du système immunitaire, le métabolisme du peroxysome, l'induction du cytochrome P450, la synthèse de l'oxyde nitrique, le métabolisme du glutathion pouvant laisser échapper un électron ainsi que la respiration mitochondriale tel qu'illustré à la figure 11 (Girard and Boiteux, 1997). De plus, le taux de ROS est influencé par différents styles de vie tels la présence d'exercice, la diète, l'alcool et le tabagisme (Moller et al., 1996). Il est estimé que chaque cellule humaine est bombardée d'environ 10 000 réactions oxydantes par jour, qui par le fait même peuvent occasionner 10 000 dommages oxydatifs, ce qui en fait le dommage le plus fréquent (Ames, 1989). Les lésions peuvent survenir par une attaque directe au corps d'ADN (sur un nucléotide) ou par l'incorporation d'un nucléoside triphosphate déjà endommagé lors de la réplication.

La cellule fait face aux espèces réactives oxygénées en activant plusieurs enzymes favorisant leur inactivation. Les enzymes anti-oxydantes requises pour l'élimination des ROS sont les suivantes: la superoxyde dismutase qui transforme le radical anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Celui-ci sera pris en charge par la catalase qui le dismutera en oxygène et en eau. Une autre façon pour la cellule de transformer le H_2O_2 est de se servir de la glutathione peroxydase; le glutathion s'oxydera libérant ainsi deux hydrogènes ce qui aura pour résultante deux molécules d'eau et un glutathion oxydé. Pour éviter la formation de radicaux hydroxyls, la cellule voudra éviter la présence de la réaction de Fenton en séquestrant les ions métalliques (Fe^{2+}) en ferritine (voir figure 11) (Friedberg et al., 1995; Morel and Barouki, 1998).

La réaction de Fenton réfère à la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et des ions ferreux complexés à un ligand, qui peut prendre la forme de n'importe quel chélateur biologique. Lors de la réaction, l'échange d'un électron du fer au peroxyde d'hydrogène va produire une espèce oxygénée très réactive: le radical hydroxyl. Les facteurs limitants de cette réaction sont

la disponibilité du peroxyde d'hydrogène ainsi que celle du fer, qui est reliée au nombre de site occupé par le chélateur sur le fer (Winterbourn, 1995).

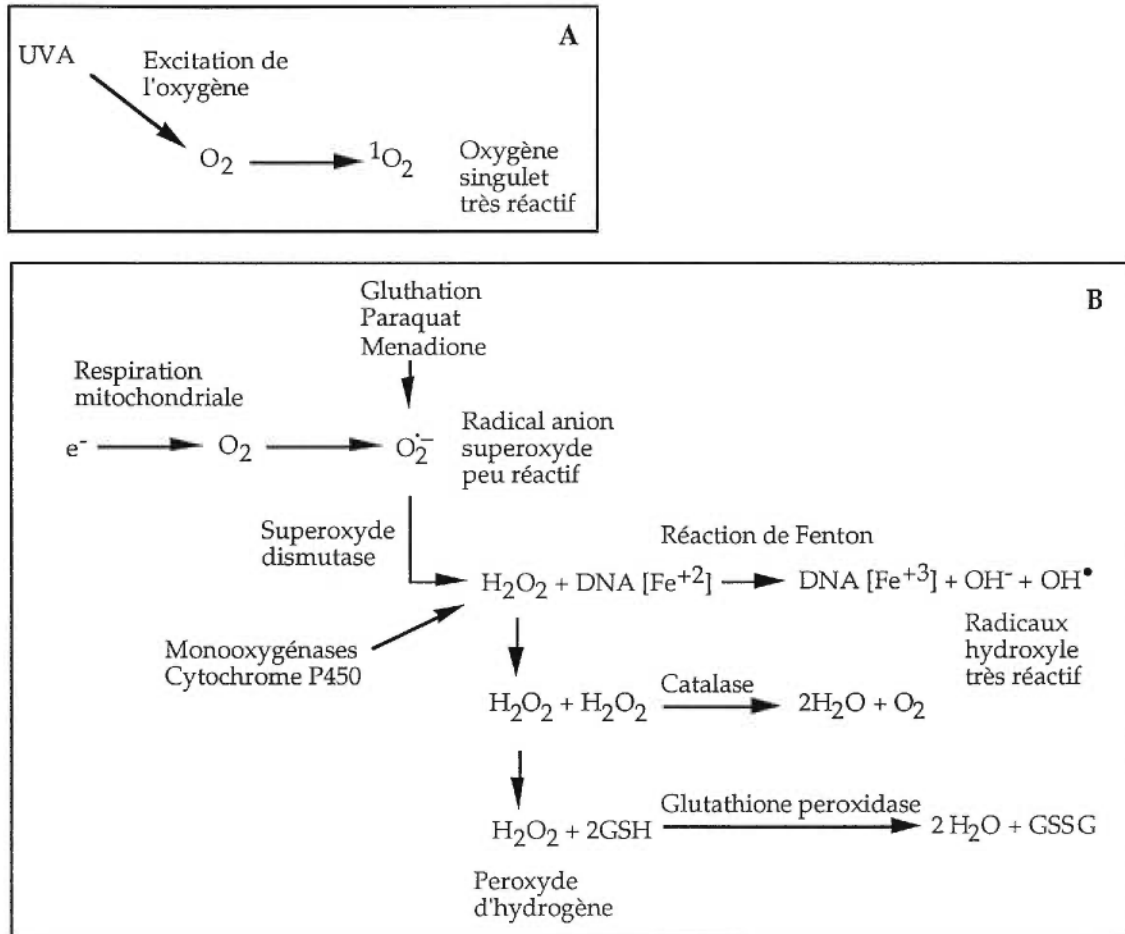


Figure 11: A) Production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par les UVA et B) selon les mécanismes endogènes, exogènes et détoxification de ceux-ci. Figure adaptée de Morel and Barouki, 1998.

On parle de stress oxydant lorsque la cellule n'est plus capable de faire face aux attaques oxygénées, soit par une trop grande abondance de ROS ou encore par une défaillance des systèmes anti-oxydants (Morel and Barouki, 1998). Chez la bactérie *E. coli*, la quantité anormale de ROS est détectée par deux facteurs de transcription: *soxRS* et *oxyR*. Le gène *soxR* est un senseur de radical anion superoxyde et *oxyR*, de peroxyde d'hydrogène (Dempsey, 1991;

Demple and Amabile-Cuevas, 1991). Lorsque *soxR* change de conformation par la présence de radicaux, il activera la transcription de *soxS*. *soxS* lui-même activera la transcription du gène de la superoxyde dismutase (*sodA*) ainsi que l'enzyme de réparation, l'endonucléase IV (*nfo*). Le gène *oxyR* contrôle l'expression du gène de la catalase (*katG*) ainsi que celui de la NADPH-dépendante alkyl hydroperoxidase (*ahpFC*) qui détoxifient les radicaux oxygénés (Stortz et al., 1990). Aucun homologue des gènes *soxR/S*, *oxyR* n'a été retrouvé chez l'humain, par contre, plusieurs facteurs de transcription sont activés ou au contraire, réprimés par le stress oxydant.

En ce qui concerne la levure *S. cerevisiae*, l'élément de réponse au stress (STRE) dont la séquence consensus est AGGGG ou CCCCT peut être activé par de multiples genres de stress dont le stress oxydatif (Marchler et al., 1993; Ruis and Schüller, 1995). Des gènes pouvant être impliqués dans la réponse au stress oxydatif, tout en étant régulés par le STRE sont, entre autres, la *CTTI* (catalase cytosolique), *DDR2* (réparation des dommages à l'ADN), *SOD2* (superoxyde dismutase mitochondriale) (Toone and Jones, 1998). Un gène majeur dans la protection de la cellule contre le stress oxydant est le gène *YAPI*; facteur de transcription provenant de la famille AP-1 (Harshman et al., 1988). Lors de stress, il est transloqué du cytoplasme au noyau (Kuge et al., 1997). Ce facteur contrôle la thioredoxine (*TRX2*), la thioredoxine réductase (*TRRI*) (Kuge and Jones, 1994) ainsi que la γ -glutamylcystéine synthétase (*GSH1*) qui est l'étape limitante de la voie de synthèse du glutathion (Wu and Moye-Rowley, 1994) et la glutathione réductase (*GLRI*) (Grant et al., 1996). En plus du facteur *YAPI*, la levure est pourvue de 8 membres, jusqu'à maintenant, de la famille AP-1 (Fernandes et al., 1997). Leur rôle au niveau du stress oxydatif est présent, mais à différents niveaux.

Les ROS en plus d'attaquer l'ADN peuvent également endommager les lipides et les protéines (Moradas-Ferreira et al., 1996). La peroxydation des lipides altère l'intégrité des membranes en créant des acides gras avec une chaîne plus courte, rendant la membrane beaucoup plus perméable pour les métabolites. De plus, certains produits de la peroxydation des lipides tels que les époxydes, aldéhydes et alcanes, sont capables d'endommager l'ADN et inactiver des protéines (Moradas-Ferreira et al., 1996). Les protéines sont endommagées par l'oxydation de certains acides aminés (résidus histidine, arginine, lysine, proline, méthionine et cystéine), le pontage de ceux-ci résultant en une susceptibilité accrue envers l'action des protéases et il peut y avoir une altération grave de la fonction biologique (Wu and Levine, 1994).

Pour ce qui est des maladies pouvant être engendrées par le stress oxydatif, soulignons l'accélération du vieillissement (Stadtman, 1992), la dégénérescence neurologique telle que l'on peut le voir dans la maladie d'Alzheimer (Jenner, 1994) ou encore la maladie de Parkinson ainsi que l'arthrite (Morel and Barouki, 1998). Il est également admis que le stress oxydatif soit impliqué dans l'initiation et la promotion du cancer (Boyd and McGuire, 1991; Cerutti, 1994; Toyokuni et al., 1995).

Dans notre laboratoire, un mutant de S. cerevisiae a été isolé comme étant sensible à l'action du 4-NQO et, récemment, des UVA. Cette protéine délétée s'avère être un activateur de phosphotyrosyl phosphatase de la famille des PP2A. Par le double-hybride, nous avons découvert que cet activateur interagissait avec un membre de la famille des chaperones YDJ. Dans les sections suivantes de l'introduction, nous retrouverons donc une synthèse bibliographique sur le 4-NQO, les phosphatases et les chaperones.

1.12 Le 4-nitroquinoline 1-oxide

1.12.1 Le mécanisme d'activation du 4-nitroquinoline 1-oxide

Le 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) est un composé chimique soluble dans l'eau qui doit être préalablement réduit sous la forme du 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO-acyl) dans la cellule afin d'être actif et pour ainsi dire mutagénique (Nakahara et al., 1957; Sugimura et al., 1965). Une fois internalisé, le 4-NQO sera transformé en un dérivé hydroxy (4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide) par une nitroréduction opérée par la DT diaphorase (accepteur de quinone). Cette réduction est orchestrée par l'ajout d'un électron perdu par le NAD(P)H qui enlèvera le groupement nitreux au 4-NQO, le rendant par le fait même réduit (De Flora et al., 1988). Par la suite, le 4-HAQO, sous l'action de l'aminoacyl-tRNA synthétase (par exemple, la séryl-tRNA synthétase), par une action d'aminocétylation, est estérifié et ainsi adopte une conformation pouvant se lier de façon covalente et non-enzymatique à l'ADN et aux protéines (voir figure 12) (Matsushima et al., 1967; Miller, 1970; Tada and Tada, 1975). La dernière étape requiert de l'ATP et du Mg^{2+} comme cofacteurs (Tada and Tada, 1974). Fait à noter que la caféine inhibe la transformation du 4-NQO en 4-HAQO (par absence d'électron par le NAD(P)H), ce qui réduit par le fait même sa toxicité et sa mutagénéicité (Tsuda et al., 1984).

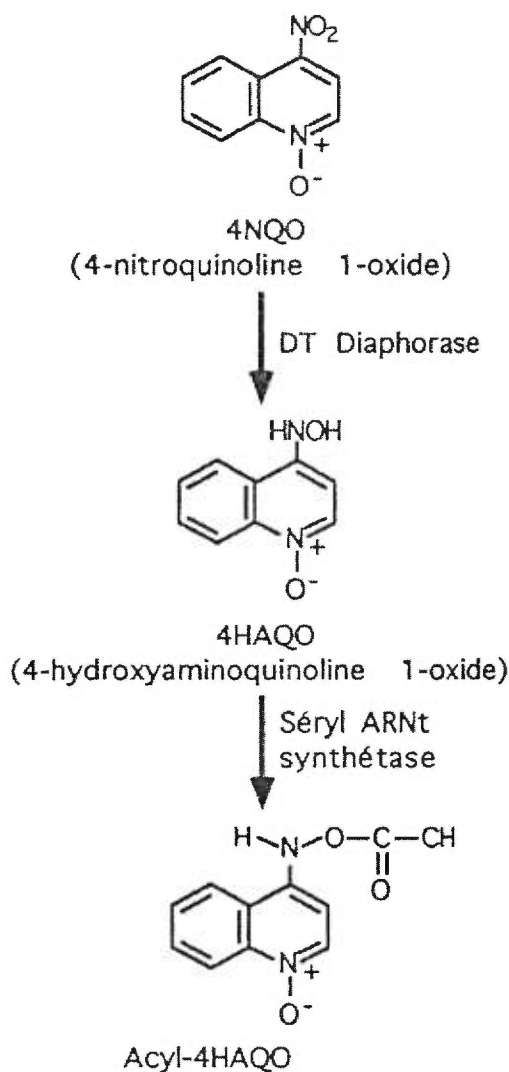


Figure 12: Mécanisme d'activation *in vivo* du 4-NQO. Le 4-NQO est métabolisé en deux étapes catalysées par la DT diaphorase (produisant le 4-HAQO) et la séryl ARNt synthétase. Le produit final de ces réactions est l'acyl-4-HAQO, la forme biologiquement active du 4-NQO. Figure tirée de Bélanger, 1997 et Kohda et al., 1986.

Lorsqu'il réagit avec l'ADN, le 4-HAQO ajoute aux purines des adduits quinolines très stables. Les quinolines se rajoutent à la position N-2 de la guanine et, en moindre proportion, en C-8 de la guanine et en position N-6 de l'adénine (voir figure 13). Également, il y a formation d'un dérivatif de la quinolone (qui se matérialise en un cycle ouvert) conséquence de la dégradation d'un des adduits (Galiègue-Zouitina et al., 1986; Galiègue-Zouitina et al., 1985; Sugimura et al., 1966). Ces lésions induisent de fortes distorsions dans l'hélice d'ADN. C'est à cause de cette distorsion encombrante que ce mutagène a longtemps été qualifié de "simulant les UV" (Felkner and Kadlubar, 1968).

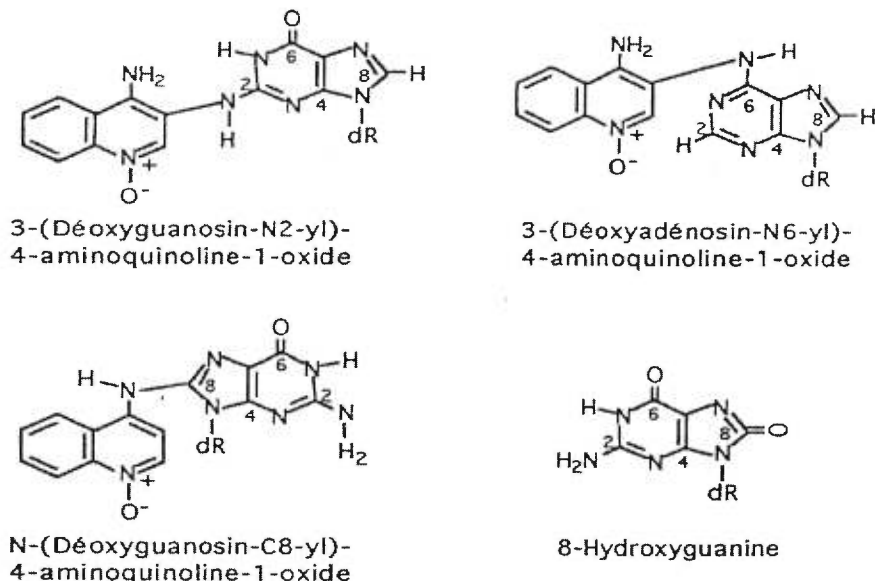


Figure 13: Représentation des dommages à l'ADN causés par le 4-NQO activé. Les bases encombrantes sont le résultat d'un ajout du groupe quinoline en N2 et C8 de la guanine et en N6 de l'adénine. Également, la 8-oxo-guanine est le résultat des dommages oxydatifs. Figure tirée de Bélanger, 1997 et Galiègue-Zouitina et al., 1985.

1.12.2 La mutagenèse occasionnée par le 4-NQO

Le carcinogène se lie préférentiellement aux résidus purines, ayant un attrait particulier pour les guanines et aucunement pour les pyrimidines (Tada and Tada, 1971). Des études comparatives chez le rat, les cellules HeLa et *E. coli* ont conclu que l'exposition au 4-NQO entraînait le même type de lésion, que ce soit chez les microorganismes ou encore chez les cellules de mammifères. Le 4-NQO transformé en 4-HQO se lierait aux guanines dans 90% des cas et aux adénines dans 10% des cas, et ce pour l'ADN et l'ARN (Tada and Tada, 1976). Les principales mutations laissées par le 4-NQO sont des transitions G:C→A:T ce qui est consistant avec le taux préférentiel qu'a le 4-NQO pour les guanines (Ishizawa and Endo, 1971; Prakash et al., 1974). Par contre, chez la levure *S. cerevisiae*, il induit également des transversions G:C→T:A et possiblement des G:C→C:G (Prakash et al., 1974).

Par une réaction oxydo-réduction cyclique, le 4-NQO accepte un électron d'une flavoenzyme réduite et devient lui-même réduit. Cette réduction pourra se transmettre à l'oxygène par un transfert d'électron semblable. La résultante sera la production de l'anion superoxyde qui peut être converti éventuellement en peroxyde d'hydrogène et en radical

hydroxyl pouvant modifier les bases environnantes, altérer les lipides (peroxydation) et produire des bris de brins (voir figure 14) (Nunoshiba and Demple, 1993; Orna and Mason, 1989; Yamamoto et al., 1993). En plus des groupements quinolones laissés par le 4-NQO, il est maintenant admis que ce carcinogène forme des 8-oxo-guanines dans l'ADN, et ce en présence de cuivre²⁺ (CuII), via la réaction de Fenton (Yamamoto et al., 1993). En effet, il existe une relation linéaire entre le nombre d'adduits quinolones liés et le nombre de 8-O-G produit dans l'ADN à un ratio de 0,2 dans les cellules ascites d'Ehrlich (Kohda et al., 1986). La formation des 8-O-G se ferait par le radical hydroxyl attaquant la position 8 de la guanine (Kataoka et al., 1967).

Des concentrations de 4-NQO peuvent provoquer des bris simple brin dans le corps d'ADN (Yamamoto et al., 1993) corrélant avec le temps d'incubation avec le 4-NQO (Yano et al., 1995). Les bris peuvent survenir lorsque qu'un adduit sur une guanine est dégradé ou lorsque la base est enlevée et que l'ADN se retrouve avec un site abasique, ceci dans des conditions alcalines (Walker and Sridhar, 1976). L'autre façon par laquelle le 4-NQO peut induire des bris simple brin par les radicaux libres, qui on le sait, provoquent la majeure partie des lésions incisant l'ADN lors d'irradiations ionisantes (Lesko et al., 1980). Également, le peroxyde d'hydrogène peut générer du radical hydroxyl par la réaction de Fenton et conséquemment induire des bris de manière indirecte. Donc, le 4-NQO simulerait aussi l'action des radiations ionisantes (Regan and Setlow, 1974; Smith and Paterson, 1980).

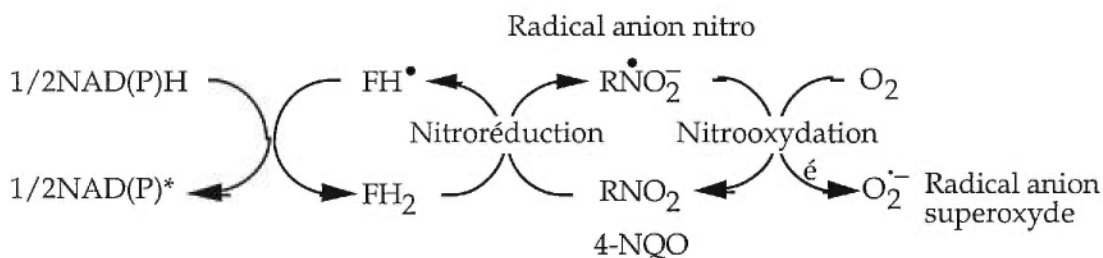


Figure 14: Formation de ROS par le 4-NQO. La nitroréduction du 4-NQO peut mener à la formation du radical anion nitro: $\text{RNO}_2\cdot^-$. L'anion superoxyde est ensuite produit alors que le $\text{RNO}_2\cdot^-$ s'oxyde en transférant son électron à l'oxygène. Le superoxyde peut conduire directement à la réaction de Fenton ou à la superoxyde dismutase tel qu'illustré précédemment à la figure 11. Figure adaptée de Orna, 1989.

1.12.3 L'exclusion cellulaire du 4-NQO

Un mécanisme par lequel la cellule tente de se débarrasser du 4-NQO est en l'exportant hors de la cellule par un procédé requérant le glutathion (GSH) et ce chez la levure comme chez l'humain. Le glutathion est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine) agissant directement ou indirectement sur plusieurs phénomènes cellulaires tels que la synthèse de protéines et d'ADN, l'activité enzymatique et la protection des cellules contre les drogues, les radiations, l'oxygène et les toxines (Meister and Anderson, 1983). Lors de l'internalisation du 4-NQO dans la cellule, celui-ci peut réagir de façon spontanée ou encore enzymatiquement avec le glutathion. Par l'action de la GSH-transférase, le GSH sera conjugué au 4-NQO pour former le composé 4-(glutathion-S-yl)-quinoline-1-oxide (Stanley et al., 1989). Ainsi, le 4-NQO ne peut plus être réduit en 4-HAQO donc il devient inoffensif pour la cellule (Stanley et al., 1992). Le 4-(glutathion-S-yl)-quinoline-1-oxide est transformé par la γ -glutamyl transpeptidase par une réaction qui transfère le conjugué γ -glutamyl à un accepteur. Par la suite, une dipeptidase changera le 4-(cystéinyglycine)-quinoline-1-oxide en 4-(cystéinylquinoline-1-oxide), suivi d'une acétylation qui résultera en la formation du 4-(N-acétylcystéinyl)-quinoline-1-oxide. Ce dernier métabolite est un acide mercapturique qui sera excrété hors de la cellule par une pompe d'exportation de conjugués-glutathion requérant l'ATP (pompe GS-X). Fait à noter que tous les conjugués-GSH sont convertis en acide mercapturique pour être finalement exclus de la cellule (voir figure 15) (Ishikawa, 1992; Meister and Anderson, 1983).

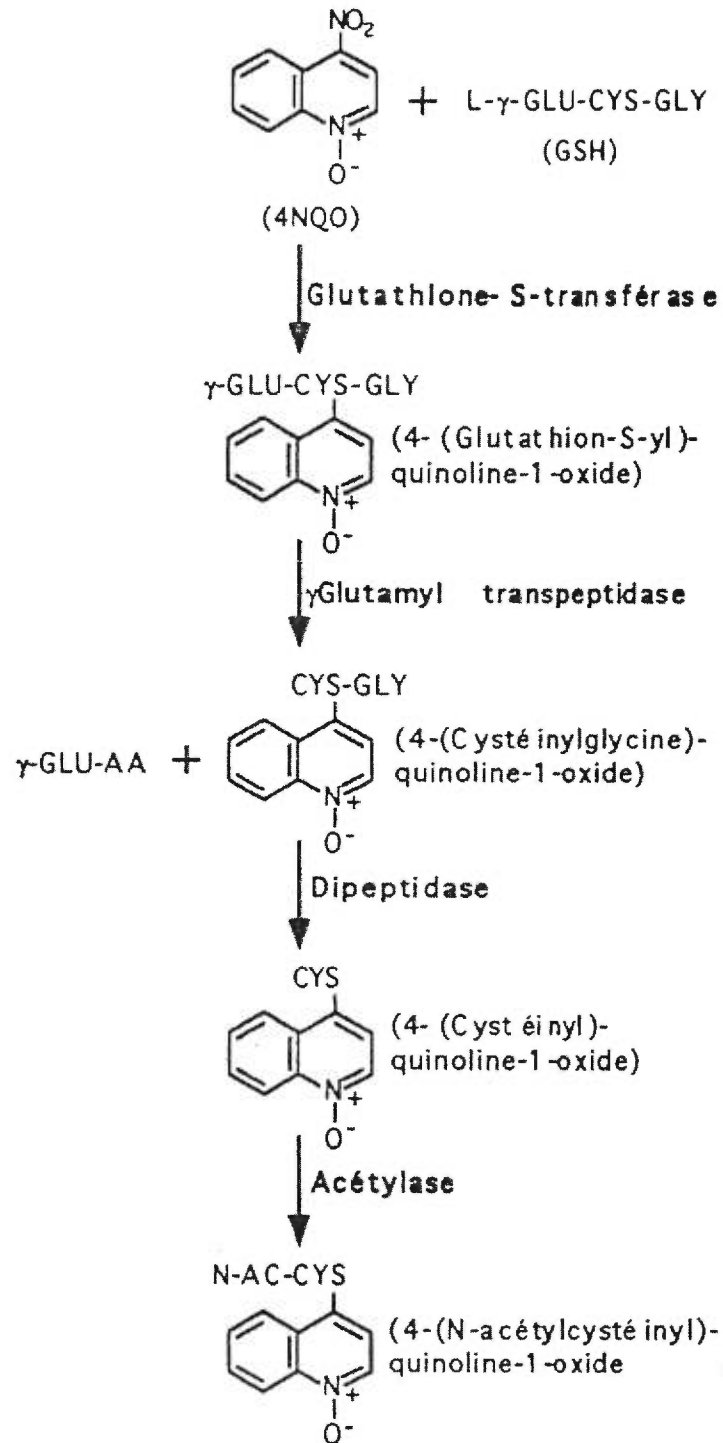


Figure 15: Détoxification du 4-NQO par la voie du glutathion. Modèle hypothétique dont le produit final de la chaîne de réactions est un acide mercapturique qui sera transporté activement hors de la cellule (voir texte pour plus de détails). Figure tirée de Bélanger, 1997 et Meister and Anderson, 1983.

Une autre façon par laquelle le 4-NQO peut être externalisé de la cellule est médiée par des gènes nommés *MDR* pour “multi-drug resistance” ou encore *PDR* “pleiotropic drug resistance”, qui une fois surexprimés, donnent une résistance aux cellules face à certains composés. Ces P-glycoprotéines réduisent la concentration cytoplasmique des métabolites donc inévitablement leur toxicité (Schinkel and Borst, 1991). Les gènes *MDR* de la levure sont composés de: *PDR1*, *SNQ1*, *SNQ2*, *SNQ3*, *PARI*, *PDR4* et *PDR5*, qui est en fait un transporteur ABC (Balzi et al., 1994) ainsi que *PDR13* qui est un homologue de la chaperone Hsp70 (Hallstrom et al., 1998). Les transporteurs membranaires du type ABC (ATP-binding cassette) vont faire passer la drogue à travers la membrane pour l’expulser. Il en est ainsi avec les protéines Snq1p et Snq2p, qui sont des perméases exportatrices. Une protéine qui va activer la transcription de *SNQ2* est Yrr1p, également requise pour la protection des cellules soumises à un traitement au 4-NQO (Cui et al., 1998). Le gène *SNQ3* est impliqué dans la détoxification générale du cytoplasme de la levure et une surexpression de ce gène confère une plus grande résistance au 4-NQO sans pour autant qu’on sache le rôle exact de la protéine (Hertle et al., 1991).

Un moyen par lequel les cellules peuvent être plus résistantes au 4-NQO est, par un disfonctionnement de l’enzyme DT diaphorase, de posséder une activité anormalement basse de réduction en 4-HAQO. Également, il peut y avoir un fonctionnement excessif d’une protéine exportatrice ayant pour résultat l’empêchement de l’accumulation cytoplasmique du composé toxique tel qu’on peut le voir dans des fibroblastes dérivés d’une famille ayant des prédispositions cancéreuses (Mirzayans et al., 1993).

1.12.4 La réparation des lésions induites par le 4-NQO

Comme le 4-NQO produit des lésions provoquant une déformation dans l’ADN, celles-ci sont réparées par le NER comme le sont les dommages “simulés”: les dimères de cyclobutane pyrimidines ou encore les photoproduits (6-4). Des études faites chez *E. coli* ou encore dans des cellules humaines ont démontré l’importance qu’a le NER dans la réparation des lésions (car il enlève tous les adduits encombrants dans l’ADN) et aussi dans la survie de ces cellules une fois traitées au 4-NQO (Ikenaga et al., 1975; Ikenaga et al., 1977). Cependant, lorsque les dommages déformant l’ADN occasionnés par le 4-NQO sont ciblés tout d’abord par la photolyase, celle-ci va empêcher la réparation des dommages par le NER causant une baisse de la survie des cellules d’*E. coli* ou de *S. cerevisiae* (voir section 1.10.1.1) (Fox et al., 1994). En ce qui concerne les lésions oxydatives, elles sont prises en charge principalement par la réparation par excision de bases et aussi par la réparation par excision de nucléotides (Scott et

al., 1999). Le 4-NQO est un inducteur de plusieurs gènes chez *E. coli*. Il induit le régulon *soxRS* qui répond à l'accumulation de dérivés oxygénés en induisant, par exemple des gènes de réparation du BER (Endo IV) ou encore en activant des gènes de détoxification des produits (tel que décrit à la section 1.11.1).

1.13 Les phosphatases cellulaires

Les phosphatases sont des enzymes enlevant des groupements phosphates à l'ADN et également aux protéines. Ainsi, elles ont un rôle majeur dans la transmission des signaux cellulaires; que ce soit pour la liaison ligant-récepteur ou encore l'association avec d'autres protéines pour l'acheminement d'un message via une cascade enzymatique. La phosphorylation des protéines peut survenir sur les résidus sérines, thréonines et/ou tyrosines. Cette modification post-traductionnelle est régie d'une façon très sensible. La classification des phosphatases repose principalement sur la nature de leur substrat, ensuite, la localisation de ces enzymes permettra de les diviser.

1.13.1 Les protéines sérine/thréonine phosphatases

Les protéines sérine/thréonine se divisent en deux classes basées sur leurs différences biochimiques soient les phosphoprotéines phosphatases (PPP) qui sont les plus abondantes et les protéines phosphatases dépendante du magnésium (PPM). Les PPP se subdivisent en PP1 (inhibées par de faibles concentration d'inhibiteur 1 et 2 (I-1 et I-2): petites protéines impliquées dans la modulation de la fonction de PP1), PP2A (activées en absence de cations divalents), PP2B (aussi appelées la calcineurine, calcium dépendante), PP4, PP5 et PP6 (Cohen, 1989). Les trois dernières agissant principalement lors du cycle cellulaire (Cohen, 1997). Les PPM sont constituées de la PP2C (dépendante du Mg^{2+}) et la pyruvate déshydrogénase phosphatase mitochondriale. Chaque sous-division est modulée par les gènes des sous-unités régulatrices des phosphatases qui confèrent la spécificité de fonction, de localisation et de substrat.

La famille des PP1 joue un rôle lors de la mitose, comme par exemple, le gène *GLC7* de la levure (Cannon et al., 1994). Les cellules délétées en *glc7* n'ont presque pas de fuseaux mitotiques, suggérant un blocage avant d'entrer en mitose (Black et al., 1995). La famille des PP1 est aussi engagée dans le maintien de l'intégrité cellulaire, la morphogénèse, la synthèse de glycogène, de la répression du glucose, du contrôle général des acides aminés ainsi que dans la méiose (Stark, 1996).

La famille des PP2B a un rôle à jouer dans la régulation de la structure de la membrane cellulaire, dans l'halotolérance, dans l'homéostasie du calcium et est régulée par la présence de calmoduline/ Ca^{2+} (Stark, 1996). La famille des PP2C est particulièrement impliquée dans les déphosphorylations de la cascade de stress chez les prokaryotes comme chez les eukaryotes. Par exemple, chez la levure, elle est activée en réponse à un choc thermique ou osmotique (Chneiweiss, 1998). Dans les autres phosphatases, PP4 est nucléaire et semble impliquée dans l'arrivée des microtubules dans le centrosome, ce qui semblait jusqu'alors attribuée à PP2A (Chneiweiss, 1998). PP5 participe à la régulation de la transcription des ARN ribosomiques tandis que PP6 est nécessaire au passage de la phase G_1 vers S dans le cycle cellulaire. Également, PP6 permet l'accumulation de l'ARNm de certaines cyclines, requises lors de la transition G2/M (Chneiweiss, 1998).

La division des PP2A est formé par un complexe des sous-unités catalytiques A et C auxquelles vient se greffer une sous-unité B ou encore un des isoformes B'. Les sous-unités A et B contrôlent l'activité et la spécificité de la sous-unité catalytique (Mumby and Walter, 1993). La famille des PP2A possède, chez *S. cerevisiae*, deux sous-unités catalytiques soient: *PPH21* et *PPH22*, étant 74% homologues à leurs réciproques humains (Sneddon et al., 1990). Ces deux gènes sont importants pour une croissance normale de la levure. En faisant des délétions des sous-unités catalytiques, la morphologie du bourgeon est altérée et les cellules ne peuvent plus entrer en mitose. De plus, la fonction PP2A est nécessaire à la bonne organisation du cytosquelette d'actine, du bourgeon et de la localisation de la chitine (Lin and Arndt, 1995). La délétion de la sous-unité B, codée par *CDC55* confère à la cellule un phénotype de sensibilité au froid (Ronne et al., 1991). Le gène *RTS1* peut se joindre au complexe AC pour former un membre de la famille des PP2A. La protéine Rst1p est induite en réponse à plusieurs stress dans la cellule et ce, médié par l'élément STRE situé dans son promoteur. Face à ceci, une des formes AB'C de PP2A pourrait moduler, ou faire partie d'une voie de réponse au stress (Evangelista et al., 1996). Chez l'humain, PP2A consiste en une structure catalytique (C36) et une sous-unité régulatrice (PR65). Associée à cette forme dimérique, s'adjoint une troisième sous-unité régulatrice variable (PR54, PR55, PR72, PR74, PR130 etc.) résultant en la formation d'une holoenzyme trimérique spécifique (Van Hoof et al., 1995). Les membres de la famille des PP2A humaines se retrouvent dans le cytoplasme, le noyau et aussi les membranes. Tout comme pour la levure, ils jouent un rôle important dans le métabolisme, la motilité, la division cellulaire, la signalisation de croissance et dans l'expression des gènes (Cayla et al., 1994).

1.13.1.1 Les protéines reliées à la famille des PP2A

Les membres de la famille des PP2A diffèrent entre eux par la sous-unité variable régulatrice faisant partie du complexe de l'holoenzyme. Les protéines suivantes font partie des protéines reliées à la famille des PP2A: Pph3p, Sit4p et Ppg1p (Stark, 1996). Le gène *PPH3* est impliqué dans la formation du bourgeon et *PPG1* dans l'accumulation de glycogène chez la levure (Stark, 1996). Par ailleurs *SIT4* est impliqué dans la régulation de transcription de certains gènes. Entre autre, il agit dans la régulation du contrôle des enzymes métabolisant le glycogène (Posas et al., 1991) et dans la transcription de certaines cyclines requises lors de la phase G₁ (Luke et al., 1996). La protéine Sit4p est toujours associée à 4 protéines Sap (Sit4-associated proteins), nécessaires au bon fonctionnement de la première (Luke et al., 1996).

1.13.1.2 Les activateurs de phosphatases

Les membres de la famille des PP2A sont principalement des phosphatases sérine/thréonine. Par contre, lorsque stimulés, ils peuvent également avoir une activité tyrosine phosphatase. Afin d'arriver à ce résultat, la participation d'ATP libre avec des phosphates PP_i, les protéines microtubulaires de tubuline, la MAP2 ou encore l'antigène moyen T/petit t des protéines virales du virus du polyome sont nécessaires (Cayla et al., 1993; Jessus et al., 1989). Un autre moyen d'y parvenir est d'avoir la contribution d'un activateur de phosphotyrosyl phosphatase (PTPA) de façon ATP et Mg²⁺ dépendante, ou de la présence de polycations, protamine ou polylysine qui sont également des stimulants. La régulation de la fonction tyrosyl phosphatase de PP2A est finement régulée puisque lors de son activation par PTPA, en absence d'ATP ou de Mg²⁺, PP2A inactivera sa fonction PTPase (Cayla et al., 1990). Puisque la fonction PTPA a été trouvée dans le cytosol d'oocytes d'amphibiens et dans une variété de cellules différenciées de mammifères, de même que son site potentiel de liaison à l'ATP retrouvé dans la séquence des PTPA à travers l'évolution, il est fortement suggéré que cette fonction soit conservée à travers le royaume animal. Sa concentration étant assez importante, il est admis que son rôle soit également majeur (Cayla et al., 1990).

Chez la levure, deux homologues, yPtpa1p (ou *RRD1*, YIL153w) et yPtpa2p (ou *RRD2*, YPL152w) ont 30-40% d'identité à la séquence de PTPA et yPtpa1p active l'activité phosphotyrosyl phosphatase de la phosphatase humaine PP2A (Van Hoof et al., 1998). Le nom RRD vient de "resistant to rapamycin deletion" et la délétion de *rrd1* rend la levure résistante à la rapamycine et à la caféine et sensible au calcium, vanadate, kétoconazole, cycloheximide et au calcofluor blanc (Rempola et al., 2000). De plus, le gène *RRD2* est inductible par le méthyl méthane-sulfonate (Jelinsky and Samson, 1999). L'homologue humain

de PTPA est un gène d'environ 60 kb. La région promotrice du gène ne contient pas de boîte TATA à l'endroit attendu. Cependant, elle possède une section riche en G-C, chose commune pour plusieurs gènes de transcription générale: "housekeeping gene" (Dynam, 1986). Le promoteur de ce gène contient les sites de liaison de différents facteurs de transcription comme: Sp1, NF- κ B, Myb, Myc, ATF et Ets-1. Seul NF- κ B a été vérifié jusqu'à présent et il n'augmente pas la régulation de PTPA (Van Hoof et al., 1995). Le locus dans lequel est situé PTPA contient également le gène *c-abl* et d'autres gènes anti-oncogène impliqués dans le cancer de la vessie. Ce locus semble donc être un bloc d'anti-oncogène (Van Hoof et al., 1995).

1.13.2 Les protéines-tyrosine phosphatases

Les cascades de transmission de signaux utilisant les tyrosines phosphorylées sont très nombreuses, que ce soit pour la différenciation, la prolifération ou la migration cellulaires (Olivero et al., 1998). Les protéines-tyrosine phosphatases (PTP) transmembranaires comportent un segment intracytoplasmique portant les domaines phosphatases, un segment transmembranaire et un segment extracellulaire variable. Des membres de la famille des PTP transmembranaires régulent le développement et la différenciation des neurones chez la drosophile (Desai et al., 1996). L'interaction de la PTP ζ et de la contactine permet l'adhérence cellulaire et le développement des axones (Peles et al., 1995) tandis que la protéine CD45, spécifique pour les cellules hématopoïétiques joue un rôle positif dans la transmission du signal en aval du récepteur de l'antigène des lymphocytes T (Okumura and Thomas, 1997).

En ce qui concerne les PTP intracytoplasmiques, deux ont été identifiés chez l'humain soit SHP-1 et SHP-2. SHP1 est exprimée dans les cellules hématopoïétiques et régule négativement la signalisation cellulaire des récepteurs des cytokines (Olivero et al., 1998). SHP-2 est recrutée par le récepteur de l'IL-2 (Nelson et al., 1997) et aussi par celui de l'insuline où elle joue un rôle d'adaptateur pour le substrat du récepteur de l'insuline (Rocchi et al., 1996). Lorsque le gène codant pour la protéine SHP-2 est délété, ceci entraîne la mort précoce des embryons (Saxton et al., 1997). Une autre protéine tyrosine phosphatase, CL100, est impliquée dans la réponse au stress oxydatif et au changement de température (Keyse and Emslie, 1992). Cette phosphatase a comme cible la "mitogen activated protein" (MAP) kinase et la rend inactive après déphosphorylation (Alessi et al., 1993). Une dernière phosphatase (apparentée à *cdc25* de *S. pombe*) est induite par une carence en azote chez la levure (Guan et al., 1992).

1.13.3 Les protéines phosphatases et la réparation d'ADN

L'équipe de Wood (1996) implique directement la phosphorylation des protéines avec la réparation de l'ADN. L'action du NER a été trouvée être sensible à l'acide okadaïque qui est un inhibiteur de la famille des phosphatases PP2A *in vitro* (Ariza et al., 1996). En présence de cet inhibiteur, la sous-unité p34 de la protéine de réplication A (RPA) devient hyperphosphorylée. Cependant aucune évidence n'a été démontrée que cette hyperphosphorylation affectait la réparation (Pan et al., 1995) puisque l'addition de RPA déphosphorylé dans l'extrait contenant l'inhibiteur ne redonne pas la fonction au NER pour autant (Ariza et al., 1996). L'ajout de phosphatase PP2A purifiée dans l'extrait balance l'état de phosphorylation de p34 et permet au NER d'effectuer son rôle de réparation (Ariza et al., 1996). L'étape requérant l'activité phosphatase est celle de reconnaissance/première incision. Par contre, dans le NER reconstitué *in vitro*, aucune phosphatase n'avait été ajoutée et le système était fonctionnel (Aboussekhra et al., 1995). La présence de la phosphatase ne serait donc que pour maximiser l'efficacité du NER. La cible exacte de déphosphorylation de PP2A n'a pas encore été trouvée (Ariza et al., 1996).

Une implication des phosphatases au niveau de la réparation pourrait être après l'action de la caséine kinase II (CKII). Celle-ci phosphoryle les résidus sérines/thréonines de l'homologue humain de l'exonucléase III de *E. coli* soit l'enzyme HAP (APE/Ref-1). Cette enzyme oeuvre dans la réparation des sites abasiques. Une fois phosphorylée sur les résidus mentionnés par la CKII, HAP n'est plus capable de cliver le substrat d'ADN contenant un site abasique. La raison de cette inactivation de l'activité de réparation est inconnue, mais l'intervention d'une phosphatase serait souhaitable pour la reprise du travail d'HAP phosphorylée (Yacoub et al., 1997). Une autre enzyme semble être sous le joug d'une kinase au sujet de son inactivation. En effet, la protéine kinase C (PKC) phosphoryle la polymérase β *in vitro* et ceci la rend inactive. En conséquence, tout système de réparation impliquant la polymérase β est négativement régulé par la PKC et nécessiterait donc une phosphatase pour rétablir la fonction de la protéine (Tokui et al., 1991).

1.14 Les chaperones cellulaires

Les chaperones sont un groupe de protéines ayant pour fonction d'assister à la conformation des protéines et ce, aussi bien sous les conditions physiologiques qu'en situations de stress. Dans tous les organismes, l'induction des chaperones est remarquablement rapide et intense, montrant bien l'urgence de leur réponse lorsque requise

(Lindquist and Craig, 1988). Elles ont la capacité de reconnaître et de se lier aux protéines natives afin de prévenir des agrégations non-spécifiques pour leur donner leur conformation fonctionnelle. L'importance des chaperones dans la cellule est telle qu'on commence à voir émerger des maladies ayant comme source une protéine à l'arrangement inadéquat comme par exemple dans l'Alzheimer, la fibrose kystique ou encore l'hypercholestérolémie familiale (Carrell and Lomas, 1997). Les chaperones se divisent en trois familles: les Hsp70, Hsp90 et les sHsp (Beissinger and Buchner, 1998). Le phénotype souvent retrouvé lorsque les chaperones sont délétées est une sensibilité aux hautes températures.

1.14.1 Les Hsp90

La famille des "heat shock protein" de 90 kDa (Hsp90) est connue pour former des complexes stables avec des protéines des voies de signaux de transduction et de la régulation du cycle cellulaire telles les protéines kinases. Les membres de cette famille sont abondants, synthétisés constitutivement, sont induits par des stress de température et jouent un rôle dans la thermotolérance (Lindquist and Craig, 1988). La fonction majeure des membres de la famille Hsp90 est de stabiliser une protéine qui subira d'autres changements de conformations suite à des signaux externes par exemple par la liaison d'une hormone (Pratt and Toft, 1997). En effet, Hsp90 se lie aux récepteurs hormonaux jusqu'à ce que l'hormone se lie au récepteur et libère Hsp90. Conséquemment, Hsp90 maintiendrait le récepteur inactif tant que l'hormone correspondante n'est pas présente (Lindquist and Craig, 1988). Les chaperones Hsp90 auraient des partenaires afin de les aider à mieux régler la conformation des protéines, mais leur identité est encore inconnue (Beissinger and Buchner, 1998).

1.14.2 Les sHSP

Les "small heat shock proteins" (sHSP) sont des chaperones ubiquitaires dont l'activité n'est pas induite sous des conditions de stress et leur action est indépendante de l'ATP. En effet, elles ont un rôle essentiel dans les processus physiologiques des cellules normales comme durant la division cellulaire ou durant les stages du développement (Arrigo, 1995). Il est également connu que l'expression des sHSP augmente la résistance des cellules envers le peroxyde d'hydrogène et le ménadione et ce, par la voie du glutathion (Arrigo, 1995; Huot et al., 1991). La conséquence de cette résistance pourrait s'expliquer par un rôle des sHSP dans la stimulation de la dégradation des protéines oxydées par les ROS (Arrigo, 1995). Toutefois, le mécanisme par lequel les sHSP réduisent les ROS ou activent la voie du glutathion n'est pas encore connu (Arrigo, 1995).

1.14.3 Les Hsp70

Les “heat shock protein” de 70 kDa (Hsp70) ont une activité monomérique ATP-dépendante. La caractéristique principale de celles-ci est de lier de petits segments hydrophobiques de protéines dénaturées (Rüdiger et al., 1997). Les Hsp70 en général sont importantes pour la conformation des protéines nouvellement synthétisées, la translocation des protéines au réticulum endoplasmique ou à la mitochondrie, à la dégradation de certaines protéines, au niveau du trafic vésiculaire, à la progression du cycle cellulaire et même dans l’apoptose (Mayer and Bukau, 1998). Les deux grands représentants des Hsp70 sont les DnaK et les DnaJ. Les DnaK ont été originalement identifiées comme protéines nécessaires à la réplication du phage lambda (Georgopoulos, 1977). Les DnaK ont deux domaines distincts, un d’activité et un de spécificité de substrat. L’action ATPase des DnaK est médiée par les DnaJ. Ces dernières sont synthétisées majoritairement en condition de stress et activent l’hydrolyse d’ATP pour capter le substrat, de façon plus stable, par les DnaK (voir figure 16) (McCarty et al., 1995). Les DnaJ lient également des protéines en ayant une activité chaperone propre. L’interaction entre les DnaK et DnaJ est médiée par le domaine dit J (4 hélices α liées par des boucles de façon à créer une structure en “doigt” séparée par une séquence conservée) retrouvé dans tous les homologues des DnaJ (Brodsky and Pipas, 1998).

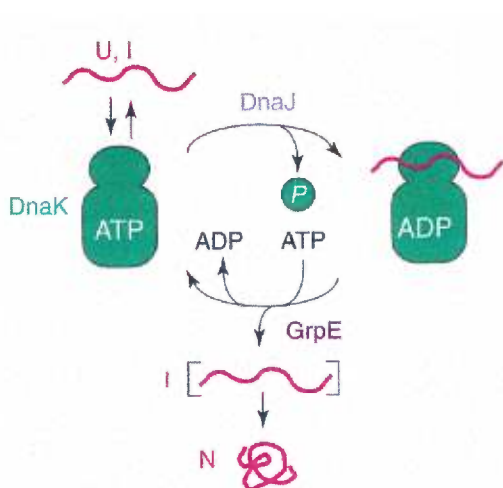


Figure 16: Modèle de la réaction cyclique des chaperones Hsp70.

L’homologue DnaK entre dans le cycle dans une conformation liée à l’ATP, caractérisée par une association et dissociation rapide au substrat. Sous la stimulation de DnaJ, qui convertit l’ATP lié en ADP, l’interaction de DnaK avec un polypeptide non-replié (U) ou un intermédiaire replié (I) est stabilisée. La protéine GrpE promouvoit le relâchement de l’ADP lié à DnaK. Des liaisons subséquentes de l’ATP permettent la dissociation du polypeptide dans sa conformation intermédiaire (I), qui peut se replier ensuite dans sa forme native (N) ou entrer dans un autre cycle d’interaction avec la chaperone DnaK. Figure tirée de Frydman and Höhfeld, 1997.

1.14.3.1 Les DnaJ

On retrouve des homologues des DnaJ chez la levure et aussi chez l'humain. Chez la levure, il existe 16 homologues dont les fonctions pour certains d'entre eux restent à être démontrées: Ssa1p, Ssa2p, Ssa3p, Ssa4p, Ssb1p, Ssb2p, Sej1p, Xdj1p, Caip, Caj1p, Mdj1p, Mdj2p, Jem1p, Sis1p, Sec63p et Ydj1p/Mas5p. Par exemple, le gène *SEC63* chez *S. cerevisiae* médie l'entrée des protéines dans le réticulum endoplasmique (Rothblatt et al., 1989). La protéine Sis1p est essentielle et lorsque délétée rend les cellules inviablés (Luke et al., 1991). *Pour les besoins du mémoire, je concentrerai mes informations sur la chaperone Ydj1p.*

La chaperone Ydj1p est située dans le cytosol et est attachée aux membranes par un groupe farnésyl situé en C-terminal de la protéine (Cyr et al., 1992). Ce groupement provient d'une modification post-traductionnelle qui est nécessaire au bon fonctionnement de la chaperone (Caplan et al., 1992). Cette farnésylation médierait sa localisation cellulaire ou encore spécifierait son action en situation de stress. Ydj1p transporte les protéines jusqu'au réticulum endoplasmique et à la mitochondrie. Sa présence est également nécessaire pour la survie de la cellule à 37°C (Caplan et al., 1992). Ydj1p interagit avec les chaperones Ssa1p/2p et Ssb1p/2p; elle régule leur fonction ATPase ainsi que leur activité de liaison au polypeptide (Cyr and Douglas, 1994; Cyr et al., 1992). Ces complexes voient à la régulation de la formation des microtubules (Oka et al., 1998).

Au niveau du cycle cellulaire, la chaperone Ydj1p est nécessaire à la phosphorylation de la cycline Cln3, requise pour la synthèse de d'autres cyclines puis pour la transition G₁-S (Yaglom et al., 1996). Lors d'une grande production de Ydj1p, la cycline Cln3 est rapidement phosphorylée menant à sa dégradation ce qui aura pour conséquence un arrêt du cycle cellulaire en G₁. Un tel phénomène peut survenir lors de choc thermique (Yaglom et al., 1996). En ce qui concerne la dégradation des protéines, Ydj1p est essentielle pour la voie de dégradation dépendante à l'ubiquitination. La chaperone peut y jouer deux rôles: i) elle facilite la reconnaissance des protéines ayant un problème conformationnel ou ii) elle sert de cofacteur pour des enzymes liant l'ubiquitine (Lee et al., 1996).

Du côté des chaperones humaines, notons, Hsj1p qui est exprimée dans les neurones (Cheetham et al., 1992). Également, Hdj2p est une protéine du cytoplasme qui n'est pas induite

1.14.4 Les chaperones et la réparation d'ADN

Les chaperones DnaK et DnaJ sont connues pour interagir avec la sous-unité UvrA du NER procaryotique. L'équipe de Van Houten (1998) a démontré que UvrA est stabilisée par la chaperone DnaK ou par une combinaison de DnaK et DnaJ et ce, dans des conditions *in vitro*. La présence des chaperones permet à UvrA d'interagir à plusieurs reprises avec UvrB, allant jusqu'à améliorer l'efficacité d'incision. Enfin, un mutant délété en *dnak* démontre une sensibilité aux UV et une baisse de l'enlèvement des dommages laissés par les UV, témoignant d'un rôle important pour la chaperone dans le NER (Zou et al., 1998).

1.15 Problématique et objectifs de ce travail

Le 4-NQO est une drogue utilisée depuis longtemps pour son aspect "simulant" les ultraviolets de type C. En effet, les dommages occasionnés par le 4-NQO sont en majorité l'apposition d'adduits encombrants sur l'ADN en la présence d'additions de groupement quinoline sur la guanine ou encore sur l'adénine. En moindre proportion, le 4-NQO forme également des dommages oxydatifs à l'ADN comme par exemple des 8-oxo-guanines.

L'intérêt du laboratoire pour le gène *yPTPA1* provient de la présence de celui-ci sur le brin complémentaire de la région promotrice du gène *IMP2* ("independent of mitochondrial partical"). Le gène *IMP2* est un gène dont l'étude est en vigueur dans le laboratoire étant donné son implication dans la résistance des cellules contre un agent anti-tumoral, la bléomycine (Masson and Ramotar, 1996). La proximité de ces deux gènes, dont l'un est déjà connu dans la réparation de l'ADN, peut amener l'identification d'un opéron concernant la réparation de l'ADN. C'est en testant différentes drogues que l'on s'est aperçu que le gène *yPTPA1* était nécessaire à la protection des cellules exposées à un traitement au 4-NQO (Bélangier, 1997).

Puisque l'on sait que le 4-NQO provoque deux types de dommages complètement différents, étant réparés par deux types de mécanismes également différents, nous avons été tentés de savoir dans laquelle des deux voies lésionnelles *yPTPA1* était impliqué. En voulant vérifier la voie des dommages encombrants, le mutant *Δytpa1* fut irradié aux UVC (254nm) et il n'en résulta aucune différence de sensibilité par rapport à la souche parentale. C'est donc avec de forts soupçons que l'on émit l'hypothèse que *yPTPA1* était impliqué dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs causés par le 4-NQO. C'est alors que d'autres

sources d'oxydants ont été essayé contre le mutant pour caractériser plus amplement son rôle dans la réparation de l'ADN ainsi que ses interactions avec d'autres protéines. Les résultats de ces travaux et l'évolution de ceux-ci sont présentés dans ce mémoire.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souches de bactéries et de levures utilisées

Organisme	Souche	Génotype
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE</i> 44 Δ <i>lacU</i> 169 \emptyset 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>hsdR</i> 17 <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 1 <i>gyrA</i> 96 <i>thi</i> -1 <i>relA</i> 1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DBY747	MATa; <i>gal2</i> ; <i>can</i> ^r ; <i>leu2</i> -3, 112; <i>his3</i> - Δ 1; <i>trp1</i> -289a; <i>ura3</i> -52
	EBY3	isogénique à DBY747 excepté <i>ytpa1</i> Δ ::LEU2
	FY86	MAT α ; <i>his3</i> - Δ 200; <i>ura3</i> - 52; <i>leu2</i> Δ 1; GAL2 ⁺ ;
	EBY1	isogénique à FY86 excepté <i>ytpa1</i> Δ ::LEU2
	y433 x DRY212 (diploïde)	y433: MAT α ; <i>ura3</i> -52; <i>lys2</i> -801; <i>ade2</i> -101; <i>his3</i> Δ 200; <i>leu2</i> Δ 98 DRY212: isogénique à DBY747 excepté <i>imp2</i> Δ ::LEU2
PJ69-4A	MATa; <i>trp1</i> -901; <i>leu2</i> -3, 112; <i>ura3</i> -52; <i>his3</i> -200; <i>gal4</i> Δ ; <i>gal80</i> Δ ; LYS2::GAL1-HIS3 GAL2- ADE2; <i>met2</i> ::GAL7- <i>lacZ</i>	

2.2 Les milieux de culture

La croissance des bactéries a été effectuée dans un milieu *Luria-Bertani* (LB) (par litre: 10g de bacto-tryptone, 5g de "yeast extract" et 10g de NaCl; autoclavé, pour le milieu solide, contenant 15g de bacto-agar). Lorsque les bactéries contenaient des plasmides portant une résistance à l'ampicilline, la sélection était opérée par un ajout de 100 μ g/ml dans le milieu

solide et 200 µg/ml dans un milieu liquide d'ampicilline. La croissance des levures s'est faite soit dans le YPD un milieu riche et complet (par litre: 10g "yeast extract", 20g peptone et 20g dextrose; autoclavé, pour le milieu solide on ajoutera 20g de bacto-agar), ou dans des milieux synthétiques minimaux (par litre: 6,5g "yeast nitrogen base" sans acides aminés, 20g de dextrose et 1,73g d'un mixte d'omission tel que décrit par Sherman et al., (1983) le milieu solide contenant 20g de bacto-agar). Pour la croissance des levures contenant les plasmides exprimant la "green fluorescent protein" (GFP) à l'aide du vecteur pYES2.0 (Invitrogen), les milieux riches et d'omission sont les mêmes exceptés que la quantité de dextrose est remplacée par 0,2% de galactose afin d'activer le promoteur *GALI* et de permettre l'expression du gène d'intérêt.

2.3 Plasmides utilisés lors de l'étude

Le premier plasmide de l'étude est le plasmide récupéré du double-hybride avec yPtpa1p. Il s'agit du vecteur pGAD-C1 (James et al., 1996) contenant une partie du cadre de lecture YNL077W (*Saccharomyces cerevisiae* genetic database (SGD)) nommé *YDJ2* par son homologie à la chaperone de levure *YDJI*. La portion du gène inclus dans le vecteur s'étend du 36^e nucléotide jusqu'au nucléotide 1308 soit 80% de la séquence codante appelé pGAD-Ydj2₁₂₋₄₃₆. Le plasmide pGAD-C3 ayant 100% du gène *YDJ2*, a été construit avec un produit PCR (voir section 2.12) contenant le cadre de lecture de YNL077W coupé avec les enzymes EcoRI et XbaI, introduit dans le vecteur YEp352 (Hill et al., 1986) clivé par les mêmes enzymes. De ce nouveau plasmide, le gène fut extrait par les enzymes EcoRI/PstI pour être introduit dans le vecteur pGAD-C3 (James et al., 1996) par les mêmes enzymes (le cadre de lecture étant maintenu par l'enzyme EcoRI) générant ainsi pIB9.

Afin d'obtenir des mutants du gène *yPTPAI*, une mutagenèse aléatoire a été effectuée sur le plasmide pGBDU-*yPTPA* (section 2.15) construit par le Dr_Dindial Ramotar. Le gène *yPTPAI* muté de façon aléatoire a été coupé par les enzymes EcoRI/BamHI et réinséré dans un vecteur pGBDU-C2 (James et al., 1996) non mutagenésé. De cette façon nous avons obtenu les plasmides pIB12, pIB15 et pIB16. Les deux mutations contenues dans pIB12 ont été isolées de la façon suivante: le plasmide pIB12 fut digéré EcoRI/RcaI et la portion de 548nt fut isolée (contenant la 1^{ère} mutation E149K). Ensuite, le plasmide pGBDU-*yPTPAI* intact a été clivé par RcaI/HindIII pour en retirer un fragment de 634nt. Nous avons ligué ces deux fragments de *yPTPAI* pour ensuite les liguer au vecteur natif pGBDU-C3 EcoRI/HindIII. Ce plasmide contenant la première mutation isolée est appelé pIB13. Pour isoler la 2^{ème} mutation, G200D: le plasmide pIB12 fut digéré RcaI/HindIII et la portion de 634nt a été isolée. Après, le

plasmide intact pGBDU-*yPTPA1* fut clivé par les enzymes EcoRI/RcaI pour extraire un fragment de 548nt. Ces deux derniers fragments ont été ligués ensemble avant d'être ligués dans le vecteur pGBDU-C3 natif coupé EcoRI/HindIII. Ce plasmide a été désigné pIB14.

Le gène encodant pour la protéine de fluorescence verte (GFP) provenant du Dr Dennis J. Thiele, a été clonée en aval du promoteur *GALI* du vecteur pYES2.0 (Invitrogen) par les enzymes KpnI/EcoRI, générant pYES-GFP, construit par M. Jocelyn David. En clonant par EcoRI, les protéines se retrouvent en phase avec la GFP et on peut donc observer la présence des protéines de fusion par ce marqueur. Le gène *IMP2* fut inséré dans le plasmide pYES-GFP par les enzymes EcoRI/XhoI, créant ainsi pYES-GFP-*IMP2* construit par Dr Jean-Christophe Hoflack. De la même façon, le gène *yPTPA1* coupé par les enzymes EcoRI/SalI, forme pYES-GFP-*yPTPA1* construit par M. Jocelyn David et finalement le produit PCR de *YDJ2*, coupé EcoRI/XbaI fut également inséré dans pYES-GFP pour produire le plasmide pIB6.

Afin d'obtenir des mutants de délétions *Ydj2*, la construction du plasmide pIB11 a été nécessaire. Le plasmide YIPlac211 portant un marqueur de sélection pour l'uracile (Gietz and Sugino, 1988), a été clivé par les enzymes HindIII/EcoRI. Par la suite, une réaction catalysée par la polymérase Klenow a permis de remplir les extrémités protubérantes laissées par les enzymes pour créer des extrémités franches. Le plasmide pGAD-*Ydj2*₁₂₋₄₃₆ a été coupé HindIII/EcoRV afin de retirer un fragment de 500nt du gène *YDJ2*. Les extrémités de cet insert ont aussi été mises franches par la Klenow. Enfin, il y eut ligation de l'insert au vecteur pour former pIB11. La figure 17 illustre les plasmides utilisés.

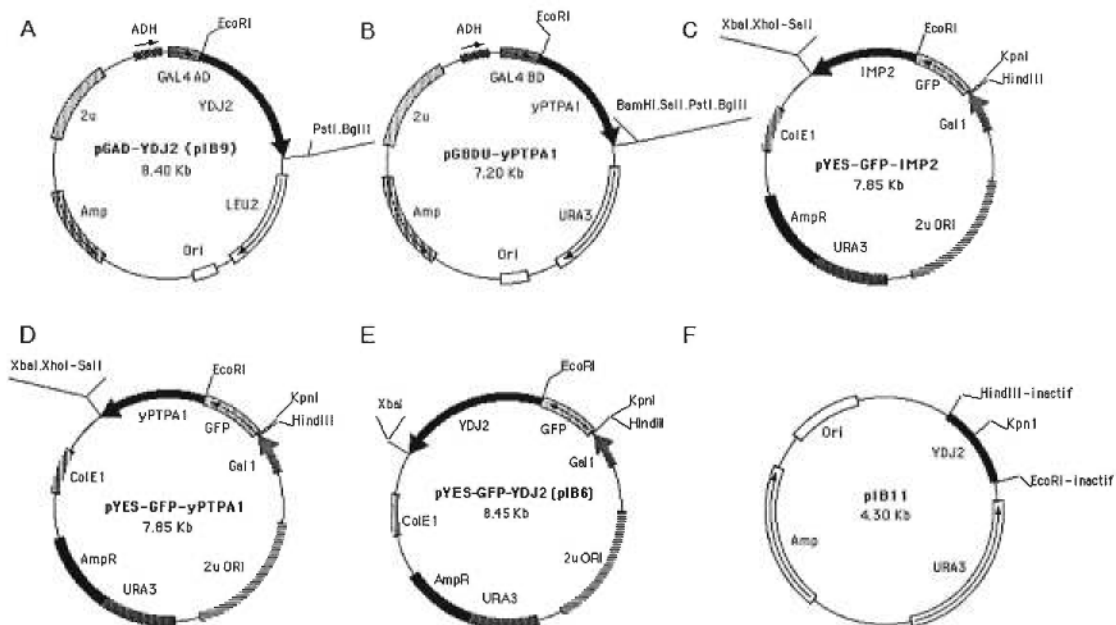


Figure 17: Plasmides utilisés lors de cette étude. A) pIB9, B) pGBDU-*yPTPA1*, C) pYES-GFP-*IMP2*, D) pYES-GFP-*yPTPA1*, E) pIB6, F) pIB11, La section 2.3 décrit plus amplement les particularités des constructions citées.

2.4 Construction des mutants de délétion de *YDJ2*

Le plasmide pIB11 a été digéré avec l'enzyme de restriction KpnI pour le linéariser tout en ayant des extrémités appartenant au gène *YDJ2*. Après avoir précipité la digestion afin de désactiver les enzymes, le plasmide a été transformé dans la souche diploïde y433 x DBY212 selon la méthode de transformation décrite à la section 2.8. Le gène *YDJ2* est inactivé chez les transformants ayant subi une recombinaison homologue entre les extrémités appartenants à *YDJ2* de pIB9 et la copie chromosomique du gène. Les transformants seront sélectionnés sur un milieu sans uracile. Un buvardage Southern (décrit à la section 2.13) permet d'identifier les transformants ayant bien intégré le plasmide YIP contenant la cassette URA au sein du gène *YDJ2*. Le mutant de délétion dans la souche diploïde a donc un génotype *ydj2^{+/Δ}*.

2.5 Préparation des cellules compétentes et transformation de *E. coli*

La prochaine procédure est basée sur le protocole décrit dans Sambrook et al., (1989). Pour effectuer la préparation de cellules compétentes d'*E. coli*, une souche préalablement congelée de DH5 α est striée sur pétri LB, laissé à 37°C toute la nuit (o/n). Une colonie isolée

est alors piquée et inoculée dans 5ml de LB contenant 6mM de $MgSO_4$ o/n. Le lendemain, la culture est diluée dans 200ml de LB + 6mM de $MgSO_4$ préalablement chauffé, puis laissée à 37°C jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0.48 à 550nm. Une fois rendue à densité voulue, les cellules sont refroidies sur glace 5 minutes puis centrifugées à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C dans des tubes (falcons) de 50ml. Le surnageant est décanté et chaque culot est resuspendu dans 20 ml de TFB I froid (30 mM de KOAc, 10mM de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 50mM de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 100mM de KCl, 15% volume/volume (v/v) glycérol-eau). Les cellules sont laissées sur glace pendant 10 minutes et sont centrifugées à 4000 rpm, pendant 10 minutes à 4°C. Une fois le surnageant enlevé, chaque culot est resuspendu avec 2ml de TFB II froid (10mM de MOPS (3-[N-morpholino] propane sulfonic acid), 75mM de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10mM de KCl, 15% v/v glycérol-eau). Les cellules maintenant compétentes sont laissées sur glace sèche pendant 15 minutes après avoir été aliquotées à 200µl par eppendorf. Les cellules sont congelées sur glace sèche et conservées à -80°C.

Pour la transformation, un aliquot de cellules (200µl) est tout d'abord décongelées puis mise sur glace pour une période de 10 minutes. L'ADN à transformer est ajouté à raison d'environ 50 ng (au plus 1/10 v/v des cellules) et le tout est laissé sur glace pour 30 minutes. Ensuite, on applique un choc thermique, de 90 secondes à 42°C ou 5 minutes à 37°C, puis 1ml de LB est ajouté dans l'eppendorf et les cellules sont incubées pour 1 heure à 37°C. Suite à ce délai, les cellules sont centrifugées et resuspendues dans 100µl de milieu pour être finalement étalées sur un pétri LB-agar contenant l'antibiotique requis. Les transformants seront obtenus au bout de 15 heures, après incubation à 37°C.

2.6 Préparation d'ADN plasmidique d'*E. coli*

La préparation d'ADN plasmidique d'*E. coli* est réalisée par la méthode de la lyse alcaline décrite par Sambrook et al., (1989).

2.7 Préparation d'ADN chromosomique de *S. cerevisiae*

La méthode pour obtenir de l'ADN chromosomique de levure est celle décrite par Ramotar et al., (1991a). Une souche désirée est inoculée dans 5ml de YPD ou milieu minimal et incubée à 30°C o/n. Les cellules sont ensuite centrifugées à 3600 rpm pendant 5 minutes. Le culot est ensuite lavé avec de l'eau stérile puis du TE 1X (0.1M Tris-HCl pH 8.0, 0.01M EDTA, pH 7.5) et centrifugé à chaque fois. Il est finalement resuspendu dans 500µl de tampon

sphéroplaste (1M sorbitol, 10mM NaPi (pH 7.0), 10mM EDTA pH 8.0) et transféré dans un eppendorf. Après avoir ajouté 10 μ l de zymolyase (Sigma) (5mg/ml) et 3 μ l de β -mercaptoéthanol (Sigma), les cellules sont incubées à 37°C pendant 20 minutes puis centrifugées. Le culot cellulaire est resuspendu dans 500 μ l d'une solution de lyse de (50mM d'EDTA pH 8.0, 0.3% SDS, 100mg de protéinase K (Sigma)) puis la solution est incubée 30 minutes à 65°C. Les cellules lysées sont alors refroidies sur glace et on ajoutera 200 μ l d'acétate de potassium 5M pendant 20 minutes afin de précipiter l'ADN. A partir d'ici, les embouts utilisés seront sectionnés dans l'extrémité pour ne pas briser l'ADN. Afin de récupérer le surnageant, on centrifuge à 4°C à 12000 rpm pendant 10 minutes. Un même volume de phénol que de surnageant est rajouté, on mélange les deux solutions par inversion puis on centrifuge 10 minutes, 12000 rpm à 4°C. L'ADN contenu dans le surnageant est précipité par deux volumes d'éthanol 95% o/n à -80°C. Le lendemain, les eppendorfs sont centrifugés 15 minutes, puis le culot est lavé avec de l'éthanol 70% et resuspendu dans 30 μ l de TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 7.5) contenant de la RNase A à 10 μ g/ml. Il faut permettre à la RNase A de digérer au moins 4 heures avant d'utiliser l'ADN.

2.8 Transformation de cellules de *S. cerevisiae*

Les cellules de levure sont transformées selon la méthode de génération de sphéroplastes décrite par Ito et al., (1983). Les cellules sont inoculées dans un ml de milieu YPD ou minimal o/n à 30°C. Le lendemain, les cellules sont diluées 1:5 dans du milieu frais et incubées pour 4 heures à 30°C. La culture est ensuite centrifugée à 3600 rpm pendant 5 minutes, lavée avec un ml d'eau puis avec 1 ml d'une solution de TE/LiAc 1X (pour 1 ml: 100 μ l de TE 10X, 100 μ l LiAc 1M pH 7.5, 800 μ l eau stérile). Les cellules sont finalement resuspendues dans 150 μ l de la dernière solution et distribuées à raison de 50 μ l par eppendorf. A ce volume sera rajouté 1 μ g d'ADN à transformer et 50 μ g d'ADN de sperme de saumon soniqué puis 300 μ l d'une solution de (PEG 3350 40% (fait à partir d'une solution de PEG 3350 50% stérile), TE 1X et LiAc 1X). Le tout est incubé à 30°C pendant 1h30. Ensuite, les cellules sont soumises à un choc thermique à 42°C pendant 15 minutes et sont centrifugées 1 minute à 12000 rpm. Elles sont resuspendues dans 75 μ l d'eau stérile et étalées sur le milieu de sélection correspondant, puis incubées à 30°C. Les transformants sont obtenus au bout de 2 jours.

2.9 Préparation d'ADN plasmidique de *S. cerevisiae*

Il s'agit du même protocole que pour extraire l'ADN chromosomique (décrit à la section 2.7) avec une modification. Après l'extraction au phénol, 30µl du surnageant est pris pour faire une transformation de *E. coli* tel que décrit à la section 2.5. Une lyse alcaline (section 2.6) sur les transformants bactériens permet de récupérer les plasmides.

2.10 Exécution du double-hybride chez *S. cerevisiae*

La technique du double-hybride sert à trouver des interactions protéines-protéines dans la levure. La technique ci-dessous est adaptée de la méthode décrite dans James et al., (1996). La souche de levure PJ69-4A est transformée avec le plasmide pGBDU-contenant l'appât (dans notre cas la *yPTPAI*) fusionné au domaine de liaison à l'ADN du promoteur *GAL4* et une librairie génomique de levure contenue dans les plasmides pGAD portant le domaine d'activation de *GAL4* (James et al., 1996). La sélection se fait sur milieu d'omission -leucine, -uracile, -adénine (-LAU) (sélectionnant l'interaction). Les transformants sont obtenus entre 2 et 7 jours après avoir fait la transformation. Pour ne sélectionner que des interactions positives et éliminer les faux-positifs, il faudra tester les premiers transformants sur milieu -leucine, -uracile, -histidine (-LUH) + 15mM de 3-aminotriazole, puis -leucine, -uracile, X-gal (-LU-X-gal). Les transformants étant positifs pour les trois tests sont alors séquencés.

2.11 Pétris de gradient

La méthode pour les tests sur pétris de gradient au 4-NQO est basée sur celle décrite par Cunningham et al., (1986) avec quelques modifications. À 30ml de YPD-agar autoclavé puis maintenu à 55°C, 1.5µl de 4-NQO (10mg/ml) est ajouté. Une fois mélangé, l'agar est versé dans un pétri carré de 9cm X 9cm. Ce dernier est ensuite maintenu incliné sur une pipette de 5ml en plastique couchée sur la paillasse, à la hauteur de la première division (soit environ 1cm du bord) avec un angle de 45°. Après que l'agar ait figé, le pétri est remis à l'horizontale et recouvert avec 35ml de YPD-agar liquéfié sans drogue cette fois. Après la prise de l'agar, le pétri est séché dans un incubateur à 37°C pendant 1 heure, couvercle enlevé. Un aliquot de 10µl d'une culture stationnaire de *S. cerevisiae* est dilué dans un ml de YPD mou (à 0,7% d'agar, maintenu à 55°C). Le tout est transféré sur la surface d'une lame de microscope stérile. Le long rebord d'une autre lame de microscope, est ensuite trempé dans la suspension de

cellules, puis mis délicatement en contact avec la surface de l'agar, de façon parallèle au gradient. Les pétris sont ensuite incubés à 30°C jusqu'à l'apparition de croissance cellulaire.

2.12 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les produits PCR nécessaires afin de construire le plasmide contenant le gène *YDJ2* ont été réalisés sur de l'ADN chromosomique. Pour ce faire, 1µg de l'amorce synthétique YDJ2:2-F (5'-TAAGAATTC(EcoRI)ATGCAACAAAACACGTCTTTA) et 1µg de l'amorce synthétique YDJ2:3-R (5'-CCCACGATCTCTAGA(XbaI)CAGGCACTAAGAAA) ont été utilisés. Le PCR a été effectué dans une réaction totalisant 100µl avec 100ng d'ADN chromosomique, les amorces, 0.2mM de dNTPs, 10% (v/v) de tampon 10X (Pharmacia), 2.5mM MgCl₂ et 5 U de Taq ADN polymérase (Pharmacia). Afin de compléter une mutagenèse aléatoire sur le gène *yPTPA1*, les amorces suivantes ont été utilisées: GBDU-UP (5'-AAGAGAGTAGTAACAAAG) et GAD-DOWN (5'-TGAAGTGAACCTGCGGGG). Les conditions de PCR sont les suivantes: un cycle de dénaturation de 95°C pendant 90 secondes, suivi d'un appariement à 53°C pour *YDJ2* et 50°C pour *yPTPA1* pendant 45 secondes et enfin un cycle de polymérisation de 72°C pour 2 minutes; le tout répété 35 fois.

2.13 Buvardage Southern

Pour vérifier si le gène *YDJ2* de *S. cerevisiae* contenait l'insertion du plasmide pIB11 soit 4.3kb, une hybridation moléculaire de type Southern a été réalisée. Cette analyse est faite sur de l'ADN génomique. L'ADN exempt d'ARN est préalablement digéré (10µg) avec une enzyme de restriction (dans notre cas EcoRI, puisque cette enzyme délimite le gène *YDJ2* dans un fragment de 3,1kb), o/n à 37°C. Le lendemain, un ajout de 10 unités d'enzyme est fait pour une période de 2 heures. Ensuite, la digestion est séparée sur un gel d'agarose 0,8% (Sigma) puis le gel est trempé dans une solution de 0.25M de HCl pour deux fois 15 minutes. Ensuite le gel est trempé dans une solution de dénaturation (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) pour 30 minutes. Le transfert sur membrane de nitrocellulose Hybond N (Amersham) est effectué dans un tampon de 0.25M NaOH, 1.5M NaCl o/n. La membrane est ensuite mise sous les UVC pendant 5 minutes afin de lier irréversiblement l'ADN. La membrane est séchée puis préhybridée dans 10ml d'une solution de church (0.5M NaPO₄, 7% SDS et 0.5mM EDTA) pendant 2 heures à 52°C. La sonde est ajoutée directement au tampon de pré-hybridation à une concentration de 1 x 10⁶cpm/ml. Dans le cas échéant, la sonde utilisée est dérivée du fragment HindIII/PstI de 1.2kb du gène *YDJ2* du plasmide pGAD-Ydj2₁₂₋₄₃₆ et préalablement marquée

au [^{32}P] par *T7 quick priming* (Pharmacia). L'hybridation radioactive est faite à 52°C o/n. Le lendemain, la membrane est lavée avec une solution de SSC 1X (150mM NaCl, 15mM citrate de sodium), 0.1% SDS, pour 15 minutes, deux fois à température de la pièce. Ensuite, on abaisse la concentration de SSC et de SDS tout en montant la température jusqu'à ce que la membrane n'émette plus que 800 cpm. Un film Biomax (Kodak) est exposé à la membrane à -80°C en présence d'un écran jusqu'au signal désiré.

2.14 Analyse informatique des séquences d'ADN

L'analyse des phases de lecture ouvertes aux bases de données Swissprot, Genbank ou *Saccharomyces cerevisiae* genetic database s'est effectuée à l'aide des programmes BESTFIT, BLAST, FASTA, TFASTA et PILEUP du UWGCG Package.

2.15 Préparation des mutants aléatoires de *ytpa1*

La mutagenèse aléatoire a été faite à partir du protocole décrit par Diaz et al., (1991) avec quelques modifications. La quantité d'ADN mutagenésée est de 5µg dans 100 µl d'une solution contenant 100mM (pour pIB12) ou 50mM de nitrite de sodium (pour pIB15 et 16) et 250mM de NaOAc pH 4.3. Le temps de mutagenèse a été de 30 minutes, ensuite les échantillons sont aliquotés en 1µg, additionnés de 80µl de TE pH 7.5, de 80µl de NaOAc 2,5mM pH 7.0 et d'1µg d'ARN de transfert (ARNt). L'ADN est ensuite précipité selon la méthode habituelle et un PCR peut ensuite être réalisé tel que décrit à la section 2.12. Suite au PCR, les fragments sont coupés avec les enzymes EcoRI/BamHI, insérés dans le vecteur natif pGBDU-C2. Les plasmides obtenus, pIB12, pIB15 et pIB16, ont été générés de cette façon.

2.16 Séquençage automatique

Le séquençage automatique des mutants de *ytpa1* a été effectué à l'aide d'un séquenceur automatique ABI377 selon les indications du manufacturier.

2.17 Préparation des cellules pour visualisation au microscope

Les cellules transformées avec les plasmides pYES-GFP-IMP2, pYES-GFP-yPTPA1 et pIB6 sont cultivées o/n dans un milieu minimal contenant 0,2% de galactose. Elles sont ensuite fixées par l'ajout au milieu de 4% de formaldéhyde pour une période de 3 heures. Les cellules sont lavées deux fois avec un tampon Tris-HCl pH 7.5, resuspendues dans 50µl de TE pH 8.0

additionnées de RNase A à 1mg/ml final. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pour 3 heures. L'ADN est coloré à l'iodure de propidium (PI) à une concentration de 5µg/ml pour une période de 15 minutes puis les levures sont visualisées sous microscope à fluorescence.

2.18 Courbes de survie

Un ml de cultures de levure en phase exponentielle est mis en présence de 4-NQO ou de diamide à différentes concentrations pour une période d'une heure. Après le délai, les différentes cultures sont diluées (10^{-4}) avec de l'eau et un aliquot de 50 à 100µl est étalé sur pétri. La courbe de survie est déterminée après avoir compté les colonies présentes suite à deux jours d'incubation à 30°C, comparée à une souche témoin n'ayant reçu aucun traitement.

Pour les courbes de survie aux différents types d'ultraviolet, les cellules en phase exponentielle sont irradiées dans des pétris de 35mm avec agitation constante pour éviter la formation de couches. Les lampes utilisées possèdent des fluorescents émettant soit des UVA ~ 300nm et plus (GE modèle F25T8-BL), UVB ~ 280 à 320nm (Spectroline modèle XX25B) ou UVC, 254nm (GE modèle G25T8). Le filtre WG 345 est utilisé pour les UVA, afin d'éliminer les rayons en deça de 320nm. Le filtre WG 305 est employé pour les UVB, afin de couper les rayons de moins de 290nm. Chacune des doses d'ultraviolet est mesurée avec un radiomètre de type Spectroline DRC 100X équipé de détecteur à UVA: DIX 365, UVB: DIX 300 et UVC: DIX 254.

III. RÉSULTATS

3.1 yPtpa1 est important pour la survie de la cellule face au 4-NQO et aux UVA.

En étudiant la région promotrice du gène *IMP2* (Masson and Ramotar, 1996; Masson 1997; Masson and Ramotar, 1998), gène impliqué dans la réparation des lésions à l'ADN causées par la drogue antitumorale bléomycine, on a découvert la présence d'un cadre de lecture ouvert (ORF) en amont de ce gène. Un fois séquencé, il s'est avéré que la protéine codée par ce gène était 41% homologue au gène humain *hPTPA*. Celui-ci est un activateur de phosphotyrosyl phosphatase stimulant l'activité PTPase de PP2A (Cayla et al., 1990). En raison de cette forte homologie, on a nommé *yPTPAI* l'ORF adjacent à *IMP2*. En ayant l'idée que *yPTPAI* pouvait constituer un opéron impliqué dans la réparation de l'ADN avec *IMP2*, Édith Bélanger a débuté l'étude de ce gène et a démontré que des mutants délétés en *yptpa1* sont sensibles à la drogue 4-NQO, sensibles à la diamide tout en étant résistants aux UVC (254nm). Elle a aussi démontré que la sensibilité des mutants au 4-NQO était due à une accumulation de lésions dans l'ADN. De plus, elle a montré que les mutants ont une progression de la phase G₁ retardée et que l'expression du gène n'est pas induite en réponse aux dommages à l'ADN (Bélanger, 1997).

Puisque le mutant est sensible à l'action du 4-NQO et ne l'est pas pour les UVC (254nm), nous avons émis l'hypothèse que les dommages affectant le mutant délété en *yptpa1* ne sont pas des lésions encombrantes (semblables à celles des UVC (254nm)), mais bien des dommages oxydatifs. Pour distinguer cette possibilité, nous avons soumis le mutant *yptpa1* aux ultraviolets de type A, B et C qui causent des dommages oxydatifs ou encombrants. *Les résultats de cette section sont également illustrés dans l'annexe I de ce mémoire intitulé "A yeast homolog of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide." Article paru dans le Journal of Biological Chemistry, (1998) 273:34, 21489-21496.*

Tel qu'indiqué à la figure 18, nous avons donc effectué des courbes de survie avec différentes doses de 4-NQO, de diamide, de rayons gamma et d'ultraviolets A, B ou C (254nm), avec une souche sauvage, DBY747 et le mutant *yptpa1* nommé EBY3. Lorsque qu'un mutant est délété dans le gène *yPTPAI*, la levure devient plus sensible que la souche parentale à l'action du 4-NQO (figure 18A), des UVA (figure 18B), légèrement sensible à la diamide et aux UVB (figure 18C et D) et se comporte comme la souche sauvage face aux rayons gamma et aux UVC (254nm) (figure 18E et F).

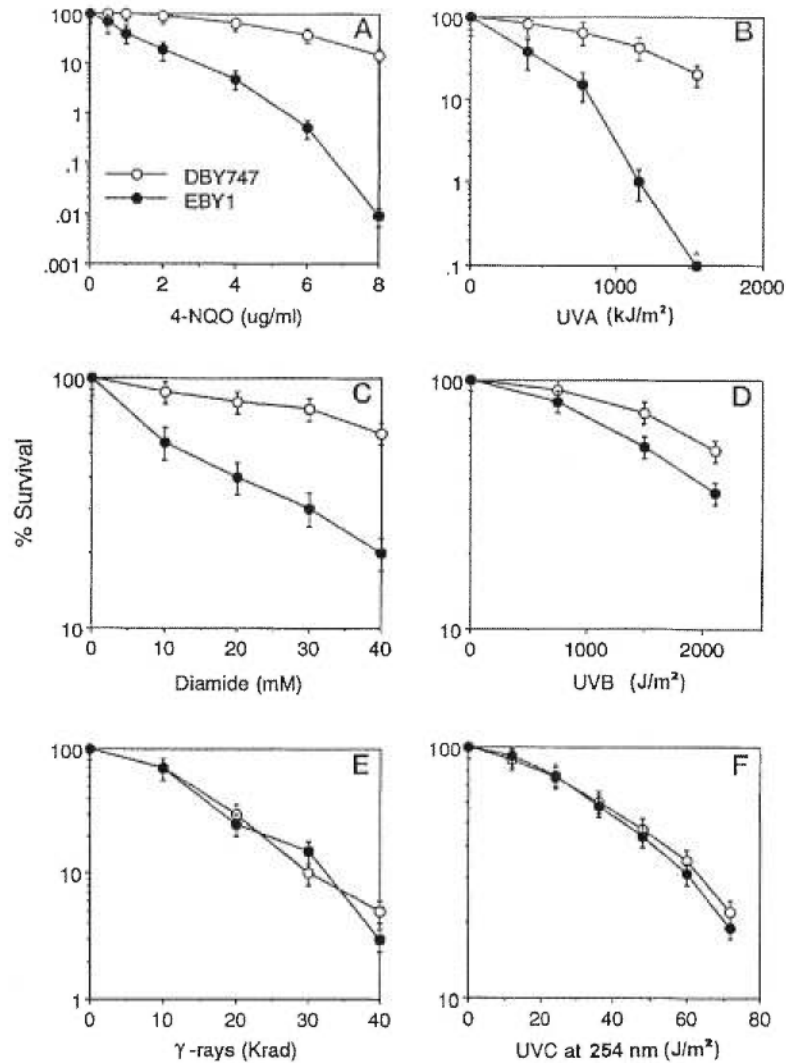


Figure 18: Courbe de survie de la souche sauvage et de la souche délétée en *Δytpa1* face à différents mutagènes. Chaque courbe de survie est la moyenne de trois expériences. Les cercles ouverts représentent la souche sauvage DBY747 et les cercles fermés le mutant *Δytpa1*, EBY3. Figure tirée de Ramotar et al., 1998.

3.2 La protéine yPtpa1p interagit avec un membre de la famille des chaperones, Ydj2p.

Chez l'humain, le gène *hPTPA* est un activateur de phosphotyrosyl phosphatase, il serait donc plausible de prétendre la même chose pour son pendant levurien. Ainsi, la protéine yPtpa1p pourrait avoir comme cible une phosphatase. La première approche effectuée par le Dr

Ramotar était de déterminer si les phosphatases connues chez la levure étaient une cible pour yPtpa1p. Les mutants de délétion des phosphatase suivantes se sont avérées ne pas être sensibles au 4-NQO (*Δpph21*, *Δpph22*, *Δpph23*, *Δppg1*, *Δglc7*, *Δcna1*, *Δcna2*, *Δppz1*, *Δppz2* et *Δsal6*). Par conséquent, nous avons déduit que ces phosphatases n'agissaient pas dans la même voie que yPtpa1p. Afin de trouver quelle phosphatase était la cible de yPtpa1p, le test du double-hybride a été réalisé par le Dr Ramotar. Le test du double-hybride a été effectué en ayant comme appât, la protéine yPtpa1p (voir figure 19).

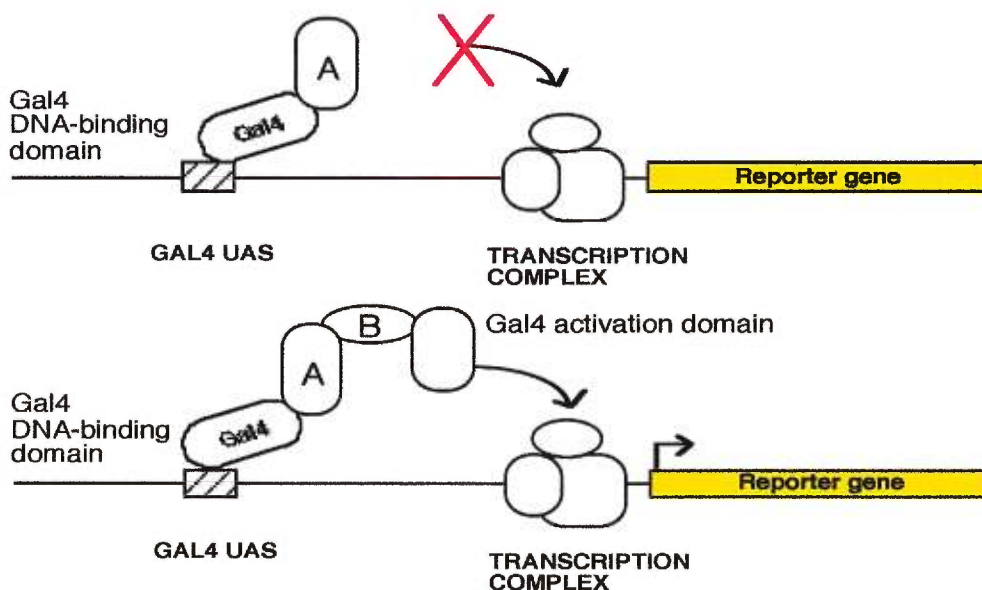


Figure 19: Fonctionnement du test du double-hybride. Le premier plasmide (pGBDU) contient une fusion du domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 et de la protéine qui sert d'appât (A) dans notre cas il s'agit de la protéine yPtpa1p. Le second plasmide (pGAD) porte la fusion d'une librairie génomique (B) de levure avec le domaine d'activation de Gal4. Ces deux plasmides sont ensuite transformés dans la souche PJ69-4A contenant 3 gènes indépendants, rapporteurs de l'interaction soit la prototrophie pour l'adénine, l'histidine et la présence d'activité β -galactosidase. Il faut absolument qu'il y ait une interaction physique entre la protéine yPtpa1p (A) et une portion de la librairie génomique (B) pour que le complexe de transcription soit fonctionnel et ainsi transcrive les gènes rapporteurs. La sélection des candidats se fait toujours sur un milieu déficient en leucine, adénine et uracil pour avoir un contexte stringent d'interaction.

Trois candidats ont été récupérés et une fois séquencés, ceux-ci se sont avérés être pour un, la chaperone mitochondriale Mdj1 et pour les deux autres, ils contenaient des bouts du cadre de lecture (ORF) appelé YNL077W. Le plus long fragment récupéré de YNL077W contenait les acides aminés 12 à 436 d'un ORF codant pour une protéine complète de 529 acides aminés ayant un poids approximatif de 63,4 kDa. Par homologie de séquence, nous avons trouvé que ce cadre de lecture était 40% homologue à un gène de chaperone déjà connu dans la levure, soit *YDJ1*. L'homologie étant telle, il fut de mise d'appeler cet ORF *YDJ2* et tel sera son appellation au cours de ce mémoire. *YDJ2* contient également le domaine J commun à toutes les chaperones DnaJ tel que décrit dans SGD (voir figure 20).

```

      . . . . 10 . . . . 20 . . . . 30 . . . . 40 . . . . 50 . . . . 60
hDj1 1: MGKID..YVQTLGLARGASDEEIKRAYRROALRVHPDKNK.EPGAEEKFKETAAYDVLSD: 57
hDj2 1: MVKETRYDYDLGVKPNATQEEELKRAYRKLALKYHPDKN.NE..GEKFKQISQAYEVLSD: 57
yDj1 1: MVKETRFYDILGVVPTATDVEIKKAYRKCALKYHPDKN.SEEAAEKFKESAAVEILSD: 59
yDj2 1: MQQNTSLYDSLNVTAASTSEIKKAYRNAALKYHPDKNNHTEESKRKFOEICQAYEILKQ: 60
      DnaJ homologous domain
      . . . . 70 . . . . 80 . . . . 90 . . . . 100 . . . . 110 . . . . 120
hDj1 58: PRKREIFDRYG.....EGLKGSGPSGGSGGANGTSFSYTFHG.DPHAMFAEFF.:106
hDj2 58: AKKRELYDKGG.....EQAIK.EGGA...GGG.....FG.SMDIFDMFF.: 92
yDj1 60: PEKRDIYDQFG.....EDGLSGAGGAGGFPGG.....FG.FGDDIFSQFF.: 99
yDj2 61: NRLRALYDQYGTTDEVLIQEQQAAQRQQAGPFSSSSNFDTTEAMSPDLSEGDLEAQFFN:120

      . . . . 130 . . . . 140 . . . . 150 . . . . 160 . . . . 170 . . . . 180
hDj1 106:.....GGR.....NPFDTFFGQRNCEE.:123
hDj2 92:.....GGG.....G...RMQRERFGKNVV:108
yDj1 99:.....GAG.....GA.QRPRGPQRGKDIK:117
yDj2 121:SSATPSSNGSKSSFNFSFNNSSTPSFSFVNGSGVNNLYSSSAKYNSENDEDHHLDRGPDIK:180

      . . . . 190 . . . . 200 . . . . 210 . . . . 220 . . . . 230 . . . . 240
hDj1 123:..GMDIDDPFSGFPFMGGGFTNV..NFGRSRSAQEPARKKQDPPVTHDLRVSLSEIYSG:178
hDj2 109:EQLSVTIEDLYNGATRKLALQKNVICDKCEBGGKKGAVECCPNCRCTGMQIRIHQIGFS:168
yDj1 118:EEISASLEELYKGRATAKLALNKQIILCKECEBGGKKGAVKCKTSCNCGQIKFVTRQMGF:176
yDj2 181:ENLKCTIKELYMGKTAKLGLNRTRICSVCDSEHGGLKKCT..CKTCKCGGIQTQTRRMGF:237

      . . . . 250 . . . . 260 . . . . 270 . . . . 280 . . . . 290 . . . . 300
hDj1 179:CTKKMKI.....SHKRLNP.....DGKSIRNEDKILTIKVKKWEKTKITFPKEG:224
hDj2 169:MVQQIQSVCMCCQGHGERISPKDRCKSCNGKIVREKKILEVHIDKMKDGORITFHHGEG:228
yDj1 177:MIQRFRQTECDVCHGTGDIIDPKDRCKSCNGKVVENERKILEVEVEPEMKDGORIVKGEA:236
yDj2 238:LVSWSQTCADCAGGVFVNKDIICQQCQGLGFIKERKILQVTVQPESCHNQLIVLTGEG:297

      . . . . 310 . . . . 320 . . . . 330 . . . . 340 . . . . 350 . . . . 360
hDj1 225:DOT.....SNNIPADIVF.VLKDKEPHNIEKROGSDVI.YPARISLREALCGCTVNVN:274
hDj2 229:DQE.....PGLPEDI.II.VLDQRDHAVFTRRGEDLF.MCMDIQLVEALCGFQKPIIS:278
yDj1 237:DQA.....PDVIPGDVVF.IVSERPHKSEKROGDDL.V.YEAEIDLLTATAGGEFALE:286
yDj2 298:DEVI STKGGGHEKVI PGDVVITTLRLKDPNFQVINYSNLICKKCKLDFMTSLCGGVVYIE:357

      . . . . 370 . . . . 380 . . . . 390 . . . . 400 . . . . 410 . . . . 420
hDj1 274:.TLDCRTIPVVF.K..DVIRPGMRKVPGEGLP..LPKTPEKREDLITEFEVIEFER..IP:327
hDj2 278:.TLDNRTLVITSHFGQIVKHGDIKCVLNEGMP..LYRRPYEKRLIIIEFKVNFPENGFLS:335
yDj1 286:.HVSGDWLKVGIVPGEVIAPGMRKVIEGKMP..IPKYG.GYNLIIKFTIKFPENHFTS:342
yDj2 358:GHPSGKLIKLDIIPGEILKPGCFKTVEDMGMPKFLNGVRSGFSHLYVKFDTVTYFER..LE:415

      . . . . 430 . . . . 440 . . . . 450 . . . . 460 . . . . 470 . . . . 480
hDj1 328:QTSRTVLEQVLPI.....:340
hDj2 336:PKLSLLEKLLPER..KEVEETDEMDQVELVDFDP.NQERRRHYNGEA.YEDDEHHPRG.:390
yDj1 343:EENLKLEILPPRIVPAIPKKATVDECVLADFDPAKYNRTRASRGGANYDSDEEEQGGE:402
yDj2 416:PENAKKIQNIL...ANDKYIKAERSTMETADSDCYCDLEKSYDSVEEHVLSSFEAPNLN:471

      . . . . 490 . . . . 500 . . . . 510 . . . . 520 . . . . 530 . . . .
hDj1 .....:
hDj2 391:GVQCQTS.....:397
yDj1 403:GVQCASQ.....:409
yDj2 472:NEVIEDDDLGDLINERDSRKRNRRFDESNINNNNETKRNKYSSPVSGFYDHDINGY:528

```

Figure 20: Alignement de hDj1p, hDj2p, Ydj1p et Ydj2p. Les séquences protéiques utilisées sont: Dj1 humain (P25685), Dj2 humain (AAC37517), Dj1 de *S. cerevisiae* (S26703), Dj2 de *S. cerevisiae* (ORF YNL077W, S63009). Les boîtes indiquent que les acides aminés sont identiques dans au moins 75% des séquences analysées.

Pour vérifier si la protéine complète interagissait avec yPtpa1p, le plasmide pIB9 fut construit et essayé en double-hybride. Comme on peut le voir au tableau III l'interaction avec la protéine complète de Ydj2p avec yPtpa1p est réelle puisque 100% de la protéine interagit tout comme Ydj2p₁₂₋₄₃₆ que ce soit sur les pétris -LAU, -LUH ou -LU-X-gal qui sélectionnent pour l'interaction. On peut d'ore et déjà dire que l'interaction yPtpa1p-Ydj2p se situe, pour Ydj2p, entre les acides aminés 12 et 436 récupérés par double-hybride.

Tableau III: Interaction entre yPtpa1p et Ydj2p et Ydj2p₁₂₋₄₃₆

Fusion au domaine de liaison à l'ADN de Gal4	Fusion au domaine d'activation de Gal4	Croissance sur milieu minimal -LAU ou -LUH	Coloration sur milieu minimal (-LU) additionné de X-gal
vecteur	vecteur	- ¹	blanche ³
yPtpa1p	vecteur	-	blanche
vecteur	Ydj2p	-	blanche
yPtpa1p	Ydj2p ₁₂₋₄₃₆	++++ ²	bleue ⁴
yPtpa1p	Ydj2p	++++	bleue

⁻¹: aucune croissance après 3 jours; ++++²: croissance après 3 jours; blanche³: coloration après 3 jours de croissance; bleue⁴: coloration après 3 jours de croissance.

3.3 Acides aminés essentiels pour l'interaction yPtpa1-Ydj2p

Par mutagenèse aléatoire, nous avons voulu savoir quels étaient les acides aminés importants de yPtpa1p dans son interaction avec Ydj2p et également pour la résistance que pratique yPtpa1p face au 4-NQO. Nous avons sélectionné les mutants par l'absence d'interaction entre le pGBDU-*yptpa1* muté et pGAD-*YDJ2*. Le premier plasmide, obtenu par mutagenèse aléatoire contenant un gène *yptpa1* muté a été nommé pIB12. Un séquençage du gène entier a permis de localiser deux mutations (E149K et G200D). Ces mutations font que la protéine yPtpa1p n'interagit plus avec Ydj2p avec le test du double-hybride. De plus, ce plasmide lorsque transformé dans un mutant *yptpa1* ne permet pas une protection des cellules au 4-NQO (voir figure 21).

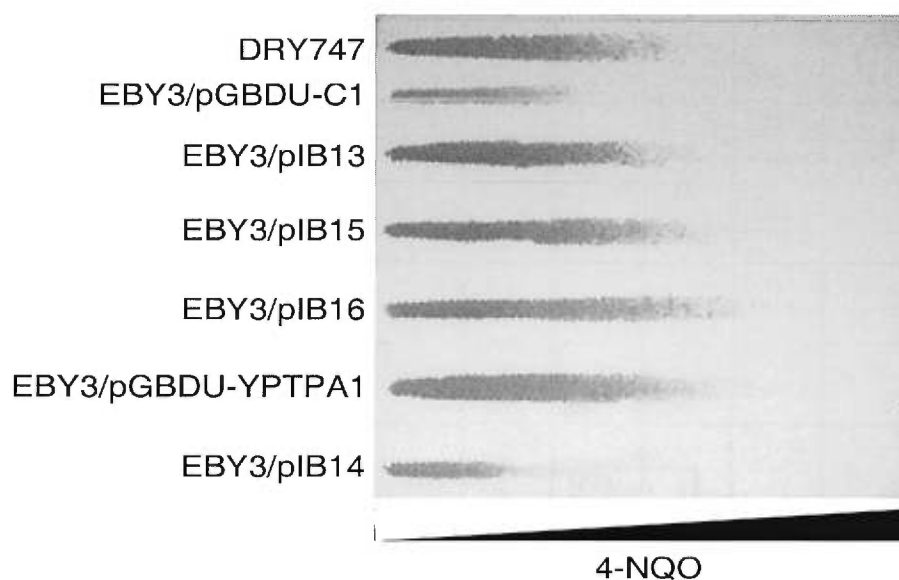


Figure 21: Sensibilité des différents mutants de *yPtpa1p* au 4-NQO sur pétri de gradient.

Afin d'évaluer l'importance de chaque mutation dans *pIB12*, nous voulu isoler les mutations séparément pour distinguer laquelle était responsable pour cette inactivation de la fonction de *yPtpa1p*. Le premier plasmide dérivé de *pIB12*, *pIB13*, contient la 1^{ère} mutation E149K (GAA en AAA) Lorsque transformé dans une souche délétée pour *yPtpa1p*, il parvient à compléter la sensibilité du mutant au 4-NQO. Le glutamate à la position 149 n'est donc pas important pour la fonction de *yPtpa1p* face à la résistance au 4-NQO. Par contre, en ce qui concerne l'interaction *yPtpa1p*-*Ydj2p*, le changement de cet acide aminé abolit le contact entre les deux protéines n'étant plus capable d'interagir dans le test du double-hybride. Le plasmide *pIB14* contient la 2^{ème} mutation, G200D (GGC en GAC), du plasmide *pIB12*. Celui-ci, n'est pas capable de compléter une levure déficiente en *yptpa1*, mais garde son interaction avec *Ydj2p*. Il en résulte donc que soit la glycine 200 est primordiale pour la bonne fonction de *yPtpa1p* contre l'action néfaste du 4-NQO en permettant à la cellule de survivre après ce traitement.

Indépendamment, les mutants *pIB15* et *pIB16* ont été générés de façon aléatoire. Malgré le fait que nous n'avons pas identifié la position exacte des mutations par séquençage, nous observons une dissociation des fonctions de *yPtpa1p*. Ces deux mutants de *yptpa1* n'interagissent plus avec la protéine native de *Ydj2p*, mais sont totalement efficaces pour protéger la cellule contre le 4-NQO. La figure 21 et le tableau IV résumant les acides aminés

mutés dans chaque plasmide, la survie au 4-NQO sur pétri de gradient et témoignent de l'interaction yPtpa1p-Ydj2p.

Tableau IV: Substitution d'acides aminés retrouvée dans yPtpa1p

Mutant	Changement d'acide(s) aminé(s) ^a	Complémentation au 4-NQO ^b	Interaction avec Ydj2p en double-hybride
pIB12	E149K, G200D	-	-
pIB13	E149K	+	-
pIB14	G200D	-	+
pIB15	ND ^c	+	-
pIB16	ND	+	-

^a: un séquençage du gène *yPTPA1* natif provenant du plasmide pGBDU-*yPTPA1* a révélé une différence avec la séquence reportée dans Genebank, soit la valine 275 changée en isoleucine.

^b: la complémentation a été effectuée sur un pétri de gradient avec 15µg de 4-NQO dans la couche inférieure du gradient.

^c: le séquençage de ces mutants n'a pas été effectué.

3.4 Localisation cellulaire des deux protéines (yPtpa1p et Ydj2p)

Puisque les protéines yPtpa1p et Ydj2p sont capables d'interagir, nous avons voulu savoir si la localisation de ces protéines était coordonnée dans la cellule de façon physiologique. Les constructions plasmidiques pGFP-*yPTPA1* et pIB6 (contenant *yPTPA1* ainsi que *YDJ2* fusionnés à la protéine de fluorescence verte (GFP)) ont été utilisés pour la visualisation. Fait à noter que la fusion pGFP-*yPTPA1* complémente la souche EBY3 (délétée en *ytpa1*). La fonctionnalité de la fusion pGFP-YDJ2 n'a par contre pas pu être démontrée. La GFP est extraite de la méduse *Aequorea victoria* et possède la particularité d'émettre de la fluorescence verte lorsqu'elle est excitée sous la lumière UV. Cette fusion permet de localiser les protéines d'intérêts dans les compartiments cellulaires sous microscopie à fluorescence (Prasher et al., 1992). L'ajout de la GFP, malgré son poids moléculaire de 27 kDa, ne modifie généralement pas la fonction des protéines marquées de plus, la GFP reste fluorescente après une fixation des cellules au formaldéhyde. La localisation de yPtpa1p et Ydj2p a été observée et comparée à

celle d'Imp2p, une protéine présumément nucléaire (Masson and Ramotar, 1996). Nos résultats en figure 22 indiquent que Imp2p se retrouve majoritairement dans le noyau (A et B). Dans le cas de yPtpa1p, elle se retrouve généralement au niveau du cytoplasme et peut-être dans la membrane ou près de la membrane (C et D). Ydj2p se retrouve en grande majorité dans le noyau.

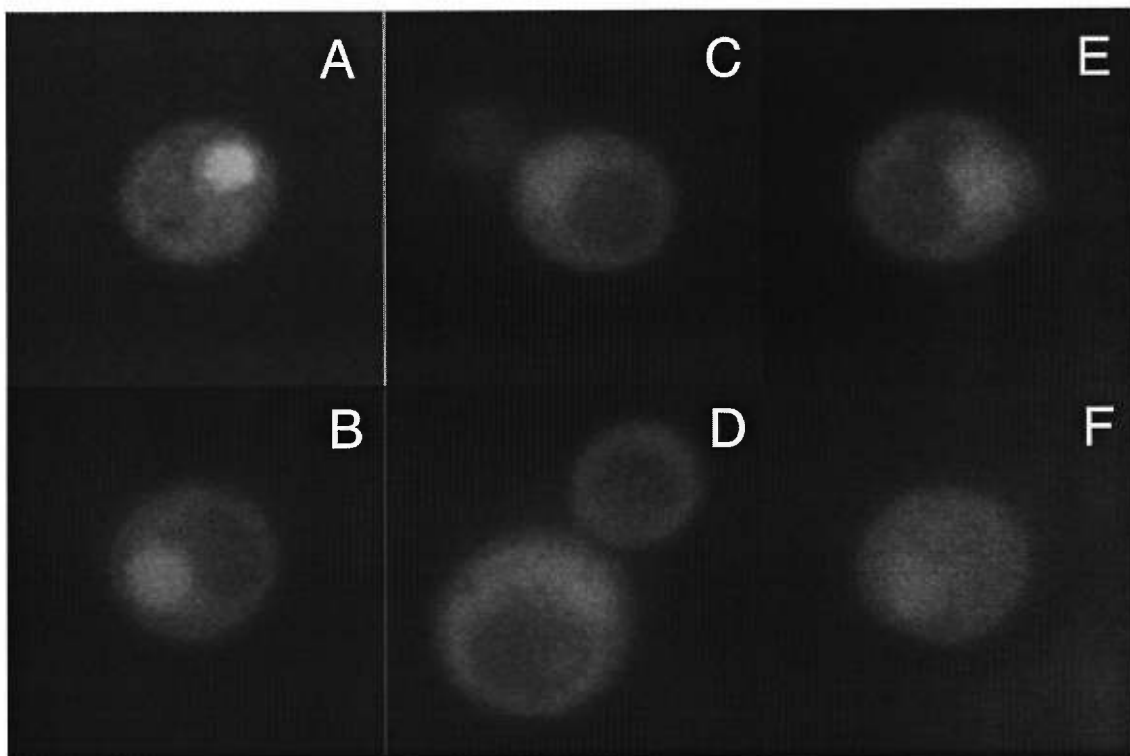


Figure 22: Localisation cellulaire des protéines Imp2p (A et B), yPtpa1p (C et D) et Ydj2p (E et F).

Nous avons également voulu savoir si dans des situations de stress la présence ou la distribution de yPtpa1p et Ydj2p pouvait être modifiée. Pour ce faire, nous avons fait subir des traitements de 4-NQO soit 1 μ g/ml durant 15 minutes à 1 heure ainsi que des chocs thermiques à 37°C pendant 15 minutes à 1 heure, pour les fusions avec yPtpa1p et Ydj2p. Aucune de ces fusions ne change de conformation ou encore de localisation après les traitements.

3.5 Déletion du gène *YDJ2* afin d'étudier sa fonction chez la levure

Nous avons voulu faire un mutant de délétion pour *YDJ2* afin de connaître un peu plus ses fonctions dans la cellule. La production des mutants fait appel à la recombinaison

homologue entre un gène de sélection (*URA3*) et le gène endogène à inactiver (*YDJ2*). Le plasmide utilisé, pIB11, est un plasmide intégratif portant un marqueur de sélection *URA3* et également une section en 5' du gène *YDJ2* afin d'assurer une recombinaison dans le locus désiré. En linéarisant ce plasmide, il y a donc remplacement par recombinaison de la copie chromosomique de *YDJ2* par la cassette *URA* du plasmide intégratif, tel qu'indiqué à la figure 23. La caractéristique principale du plasmide intégratif est de ne contenir aucune origine de répllication de levure ce qui oblige une recombinaison pour rendre les cellules prototrophes pour une base donnée, ici l'uracile. L'intégration du plasmide pIB11 au sein du gène *YDJ2*, chez les transformants sélectionnés sur un milieu minimal -URA, a été confirmée par un buvardage Southern.

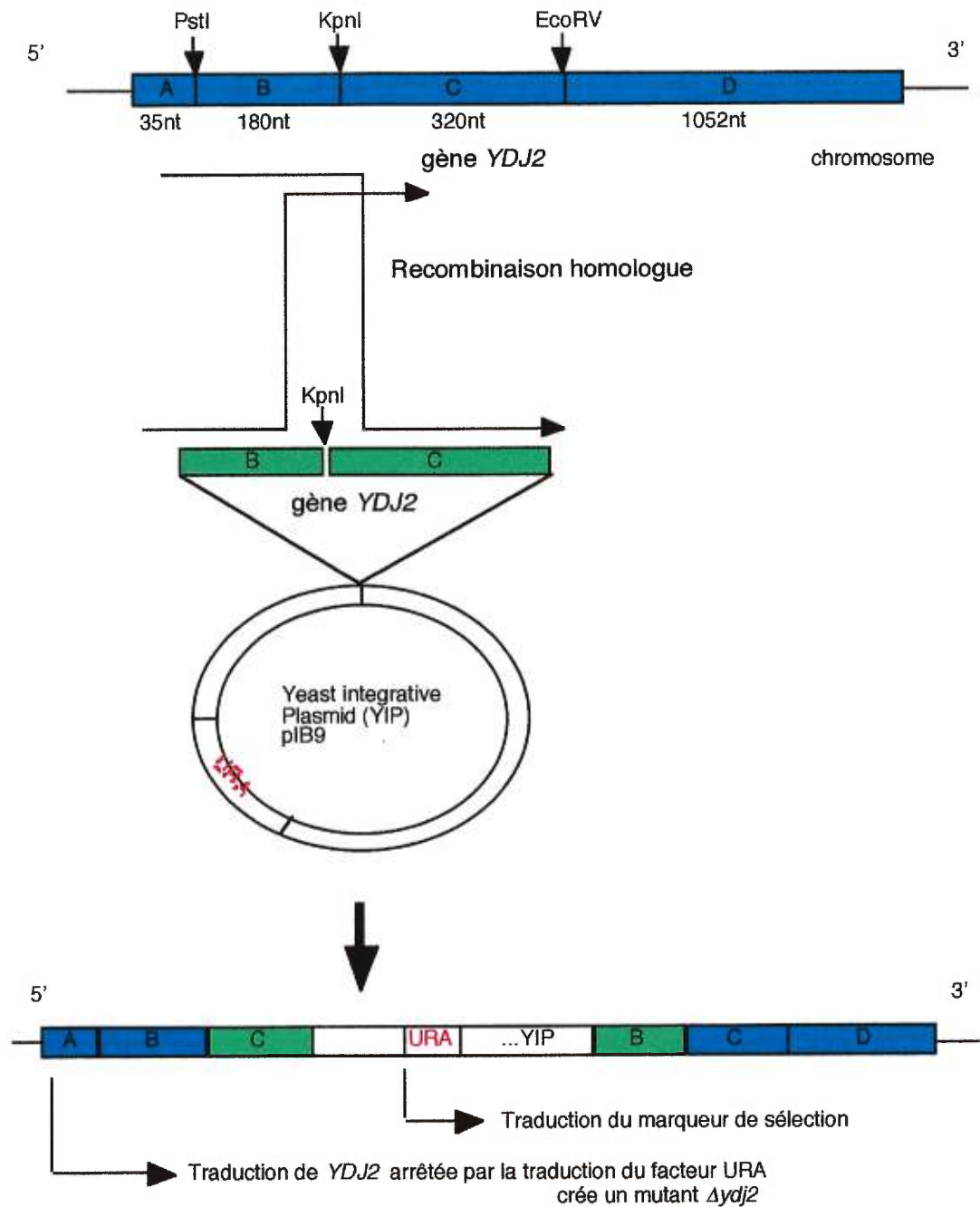


Figure 23: Délétion du gène *YDJ2* par le plasmide intégratif pIB11. Par recombinaison homologue, le plasmide intégratif linéarisé peut s'insérer dans le génome et ainsi créer un mutant de délétion pour le gène voulu (*YDJ2*).

Les premiers essais de délétion furent effectués dans une souche haploïde de levure. Préalablement au plasmide intégratif pIB11, nous avons utilisé une construction portant une cassette *URA3* insérée dans le gène *YDJ2*. Cette dernière, une fois linéarisée et transformée dans les souches sauvages DBY747 ou FY86, a donné que peu de transformants après 3 jours de croissance. Afin de vérifier si la cassette avait bel et bien été insérée dans le bon locus, un buvardage Southern ou un essai PCR sur le gène ont été effectués chacun ayant dix candidats à chaque fois, sans succès pour retrouver un mutant délété. Cette procédure a été répétée quatre fois de façon indépendante, résultant à chaque fois à la même conclusion: une intégration multiple dans le génome de la levure, et ce, dans un locus différent de *YDJ2*.

Changeant de cassette d'insertion, nous avons donc pris la cassette *TRP1*, insérée dans *YDJ2*. Plusieurs transformants ressortaient de ces transformations que ce soit avec DBY747 ou FY86. Sept buvardages Southern comprenant dix candidats potentiels chacun ont été réalisés. Similairement aux résultats observés avec la cassette *URA3*, les buvardages avaient un profil identique, soit une intégration multiple du plasmide dans un locus autre que *YDJ2*. Par homologie de séquences, nous n'avons pas pu identifier dans le génome de la levure des gènes qui pourraient permettre une intégration des cassettes *URA3* ou *TRP1*. Des essais de transformations sur une souche ayant une chromatine moins condensée (délétée en une des histones) ont été essayés, toujours sans succès. Ce travail très fastidieux nous a permis de soupçonner un rôle essentiel joué par *Ydj2p* dans la cellule, et que peut-être la délétion du gène *YDJ2* dans la cellule était tout simplement létale dans une levure haploïde.

Ainsi, la délétion du gène fut plutôt réalisée dans une cellule diploïde en utilisant le plasmide intégratif pIB11. Si le gène est nécessaire à la survie de la levure, sa délétion dans une cellule diploïde permet tout de même une croissance de la cellule puisqu'elle conserve une copie chromosomique intacte du gène d'intérêt. Contrairement à la situation observée dans les cellules haploïdes, nous avons obtenu des transformants ayant une cassette intégrée dans le bon locus. Comme indiqué à la figure 24, le mutant $\Delta ydj2^{+/}$ possède effectivement une copie conservée du gène à 3.1 kb et une copie ayant subi de la recombinaison homologue à 7.4 kb.

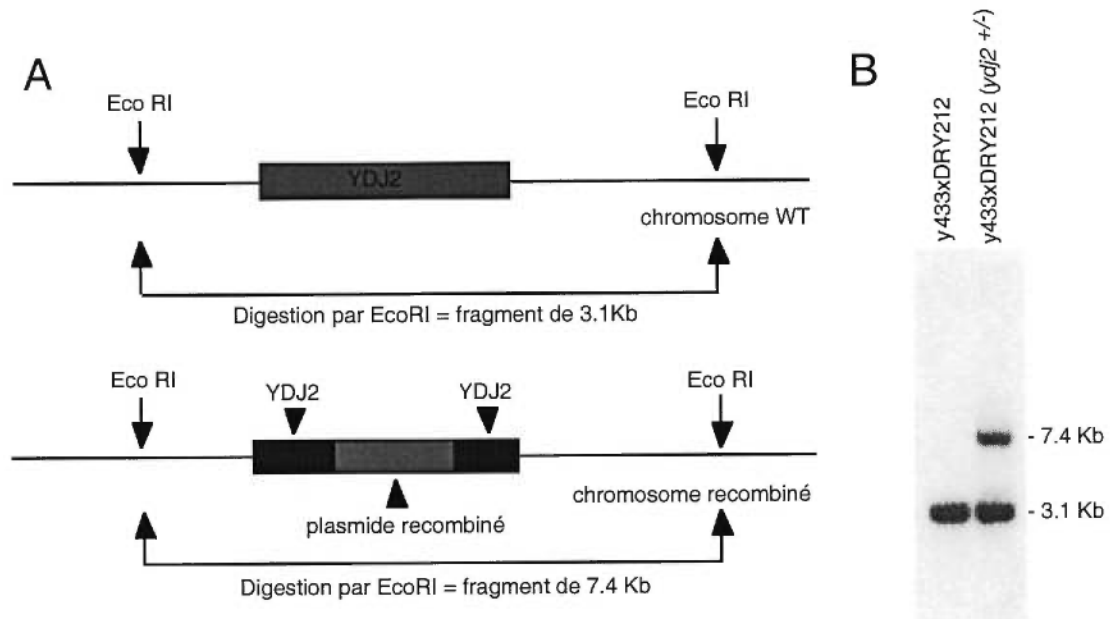


Figure 24: (A) Schéma des fragments attendus suite à la recombinaison du plasmide intégratif pIB11 au locus du gène *YDJ2*. (B) Buvardage Southern sur le mutant $\Delta y dj2^{+/-}$ dans une souche diploïde de levure. Le premier puit est la représentation d'une souche sauvage (y433 x DRY212) et le deuxième, celui de la souche déléetée en *y dj2*^{+/}.

IV. DISCUSSION

4.1 yPtpa1p est nécessaire pour la protection des cellules contre les dommages oxydatifs causés par le 4-NQO et les UVA

Le 4-NQO est un agent dit simulant les dommages créés par les ultraviolets de types C (254nm). Cependant, il est de plus en plus accepté que cette drogue, une fois internalisée dans la cellule provoque des dommages oxydatifs. Nous avons ici une autre preuve comme quoi le 4-NQO est responsable de la création de lésions oxydatives dans la cellule. En effet, un mutant de délétion *Δytpa1* est sensible aux effets du 4-NQO tout en présentant une résistance similaire à la souche sauvage face à un traitement aux UVC (254nm). Dans le cas où le 4-NQO ne faisait que des dommages provoquant des encombrements dans l'ADN tout comme le font les UVC (254nm), il est clair que le mutant *Δytpa1* serait également sensible à ces mêmes UVC (254nm). Une preuve additionnelle est que le mutant *Δytpa1* est très sensible à l'action des UVA qui produisent des dommages oxydatifs. Les UVB quant à eux, provoquent environ 80% d'adduits encombrants l'ADN et 20% de dommages oxydatifs. Ainsi, le mutant *Δytpa1* est peu sensible aux UVB et on peut déduire qu'il n'est affecté que par le 20% de dommages oxydatifs ce qui expliquerait l'apparence de la courbe de survie comparativement à celle observée après un traitement aux UVA.

Comme on peut le voir en annexe I, le mutant *Δytpa1* n'est pas sensible aux effets des radiations ionisantes, qui par des radicaux hydroxyls vont provoquer des bris de brins. Par ceci et par le fait que le mutant *Δytpa1* n'est pas sensible à la bléomycine (Ramotar et al., 1998), nous avons l'évidence que la lacune de réparation ne se situe pas dans la voie de réparation par recombinaison des bris doubles brin (Paques and Haber, 1997). Ainsi, il est possible de conclure que les lésions communes au 4-NQO et aux UVA ne se situent pas par les radicaux hydroxyls. Les UVA ajoutent un électron à l'oxygène (pour créer l'oxygène singulet) et c'est cette molécule excitée qui ira altérer les bases et ensuite entraîner des mutations. Le 4-NQO pourrait avoir une même action et ainsi, exciter l'oxygène pour créer des mutations. Les UVA par contre, forment préférentiellement des 8-O-G comme mutations. Des résultats non-publiés dans le laboratoire du Dr Ramotar démontrent que les lésions communes au 4-NQO et aux UVA ne seraient pas les 8-O-G puisque des mutants levuriens délétés au niveau des enzymes réparant ce type de lésion (soit la protéine Ogg1p et Apn1p) ne sont pas sensibles ni à l'action du 4-NQO ou à l'action des UVA. Enfin, une preuve pour appuyer ces dires serait de faire des doubles mutants et de répéter les expériences afin d'éviter des phénomènes de redondance de fonction. Par contre, si ce n'est pas les 8-O-G qui sont les lésions communes aux deux agents, il est difficile d'identifier leur nature exacte.

4.2 Quel serait le rôle de yPtpa1p contre l'action du 4-NQO ou des UVA?

Comme démontré en annexe I, la présence de yPtpa1p est nécessaire pour la réparation de l'ADN suite à une agression par le 4-NQO. La protéine humaine hPtpa est connue comme étant un activateur de phosphotyrosyl phosphatase (PP2A) (Cayla et al., 1990). Il serait logique de penser que l'homologue de levure détient également cette même fonction sans pour autant en avoir la preuve. D'une façon similaire, il est possible que la protéine humaine hPtpa tout comme yPtpa1p ait une fonction dans la réparation de l'ADN.

Il a été démontré que la fonction Ser/Thr phosphatase de la famille des PP2A était requise pour la modulation de l'étape de reconnaissance des dommages réparés par le NER. *In vitro*, lorsque des protéines phosphatases PP2A sont présentes, il appert que l'étape de reconnaissance et de première incision est à son efficacité maximum alors qu'en présence d'inhibiteur des PP2A, la réparation est arrêtée. La cible des phosphatases n'a pas été identifiée (Ariza et al., 1996). Cependant, cette action des PP2A dans le NER pourrait être indépendante de l'action d'un homologue humain de yPtpa1p puisque celle-ci n'est pas impliquée dans le NER chez *S. cerevisiae*.

Il a été établi que les UVA augmentaient le niveau de protéine PKC dans la cellule (Matsui et al., 1994). D'une façon indépendante, la PKC phosphoryle la polymérase β *in vitro* ce qui la rend inapte à son travail et par le fait même, inadéquate pour la polymérisation de l'ADN dans le BER (Tokui et al., 1991). Ces deux résultats pourraient nous faire penser que la présence d'une phosphatase est nécessaire afin d'enrayer l'inactivation pratiquée par la phosphorylation de la polymérase β . Nos résultats indiquent que l'absence d'un activateur de phosphotyrosyl phosphatase rend les levures sensibles à l'action des UVA. yPtpa1p pourrait donc être l'activateur de la phosphatase allant à l'encontre de la phosphorylation par la PKC sur la polymérase β permettant le fonctionnement du BER.

Une tyrosine/sérine phosphatase est maintenant connue comme étant impliquée dans la réponse cellulaire face au stress oxydant et aux chocs thermiques. Il s'agit de la protéine Cl100 humaine dont la fonction n'a pas été déterminée jusqu'à présent. L'ARN messager de cette protéine est fortement induit par le ménadione (générateur du superoxyde), par les UVA ainsi que par les chocs thermiques (Keyse and Emslie, 1992). Une autre phosphatase a été trouvée comme étant induite par les radiations ionisantes de façon p53 dépendante et c'est la protéine

Wip1p, membre des phosphatases PP2C (Fiscella et al., 1997). L'ARN messager de *WIP1* est induit rapidement en réponse aux radiations ionisantes et la protéine se retrouve au noyau (Fiscella et al., 1997). Le gène *RTS* de levure, lorsque joint au complexe AC pour former un membre de la famille des PP2A assemble une protéine qui réagit et qui est induite par plusieurs stress et ce, par l'élément STRE de son promoteur (Evangelista et al., 1996).

Afin de déterminer si, tout comme les exemples précédents, *yPTPA1* pouvait être activé transcriptionnellement suite à un stress oxydatif, le promoteur a été analysé. On y retrouve un élément STRE (CCCCT) à la position -289. Rappelons ici que l'élément STRE ("stress response element") est un site localisé sur le promoteur de certains gènes, sur lequel peut se lier des activateurs de transcription qui sont régulés positivement lors d'une situation de stress. La présence d'un tel élément dans le promoteur de *yPTPA1* pourrait dire que ce gène peut être induit transcriptionnellement en situation de stress. Cependant, malgré la présence de l'élément STRE, lorsque le promoteur de *yPTPA1* est fusionné au gène rapporteur de la β -galactosidase, il n'y a aucune induction causée par des agents provoquant du stress oxydatif dans la cellule (Bélanger, 1997). Ceci pourrait dire que l'activation de la fonction tyrosine phosphatase de la famille des PP2A, induite par yPtpa1p, pourrait être accomplie suite à un changement de conformation ou à une modification post-traductionnelle de yPtpa1p par le stress oxydatif. Il est généralement admis que la présence de la fonction PTPA est presque ubiquitaire et que l'expression est constitutive (Cayla et al., 1990).

4.3 yPtpa1p interagit avec un membre de la famille des chaperones

yPtpa1p est l'homologue de l'activateur de phosphotyrosyl phosphatase hPtpa. Comme la déduction logique est de penser que yPtpa1p est un activateur de phosphotyrosyl phosphatase également, nous avons voulu savoir quelle phosphatase était activée par yPtpa1p. C'est par le test du double-hybride, qui récupère les interactions protéine-protéine que la stratégie a été élaborée. Contrairement à nos attentes, non pas une phosphatase, mais bien l'ORF YNL077W, ayant 40% d'homologie à la chaperone Ydj1p, a été repêché. Etant donné l'homologie unissant les deux gènes, il a été convenu de l'appeler *YDJ2*. Nous avons tenté de confirmer cette interaction à l'aide d'expériences biochimiques. Nous avons tenté en vain d'immunoprécipiter un complexe Gal4_{abd}yPtpa1p-Ydj2pGal4_{ad} en utilisant des anticorps dirigés contre le domaine de liaison à l'ADN et d'activation de la transcription de Gal4. Une hypothèse formulée par le Dr Ramotar pour expliquer ce résultat serait que yPtpa1p serait dans un complexe énorme et que celui-ci serait précipité lors de la centrifugation lors de l'extraction protéique. Plus simplement, de meilleurs anticorps contre yPtpa1p ou Ydj2p pourraient faciliter

l'expérience, puisque le résultat d'une immunoprécipitation est toujours reliée à la qualité des anticorps de départ. Egalement, des colonnes d'affinité GST-yPtpa1p ou GST-Ydj2p ou la co-purification de yPtpa1p ou de Ydj2p et leurs protéines associées, pourrait corroborer l'interaction de ceux-ci en double-hybride.

Les chaperones sont souvent nécessaires pour aider les protéines à adopter une conformation qui leur sera indispensable pour leur bonne fonction. L'interaction yPtpa1p-Ydj2p pourrait s'expliquer comme suit: yPtpa1p doit changer sa conformation afin d'être fonctionnelle dans la cellule. Tel est le cas pour les chaperones DnaK et DnaJ qui aident à la bonne conformation de UvrA, un composante du NER prokaryote. En effet, il s'agit d'un exemple par lequel une chaperone aide un membre d'un système de réparation afin de le stabiliser (Zou et al., 1998). On peut donc créer un parallèle entre cette situation et yPtpa1p, aurait donc besoin d'une chaperone pour faciliter ou augmenter son activité soit dans la réparation de l'ADN ou dans une autre fonction connexe. Une autre façon par laquelle on peut expliquer l'interaction yPtpa1p-Ydj2p est qu'après un changement de conformation opéré par Ydj2p, yPtpa1p serait alors apte à interagir avec une phosphatase. Une autre fonction des chaperones est de transporter les protéines d'un organelle à un autre. Ydj2p agit peut-être comme moyen de transport entre le lieu où se retrouve yPtpa1p et où il est requis dans une voie de signalisation. Nous reviendrons sur ce point à la section traitant sur la GFP.

Puisque le criblage d'une librairie génomique en double-hybride s'est avéré infructueux pour déterminer l'identité de la phosphatase activée par yPtpa1p, d'autres expériences pourraient être envisagées. Premièrement, nous pourrions utiliser une autre version du test du double-hybride, soit celui caractérisant davantage la partie cytoplasmique des voies de signalisation. Par ceci, la portion cytoplasmique de la voie de signalisation dans laquelle yPtpa1p est impliquée pourrait être déchiffrée et ceci en criblant une librairie génomique, mais en se servant du double-hybride ayant lieu dans le cytoplasme (Cytotrap, Stratagene). Deuxièmement, la co-purification de yPtpa1p et de ses protéines associées, des expériences d'immunoprécipitation en utilisant un anticorps dirigé contre yPtpa1p afin d'immunoprécipiter un complexe ou une colonne d'affinité avec yPtpa1p purifiée pourrait nous permettre d'identifier cette phosphatase si elle est présente dans la levure.

4.4 Acides aminés essentiels pour l'interaction entre yPtpa1p et Ydj2p

Pour avoir plus de données caractérisant l'interaction entre yPtpa1p et Ydj2p, des mutants aléatoires sur yPtpa1p ont été réalisés. La caractérisation des acides aminés importants

pour l'interaction est basée sur l'article de Van Hoof, paru dans *Biochemistry* tel qu'illustré à la figure 25 ci-dessous (Van Hoof et al., 1998). Etant donné que les domaines importants décrits dans cet article aient été trouvés chez rPtpa1p du lapin selon la présence ou l'absence de fonction PTPase, nous nous en servons pour caractériser l'interaction de yPtpa1p et Ydj2p. Le groupe des PTPA possède quatre boîtes très conservées à travers l'évolution. Comme indiqué par Van Hoof (1998), la délétion de la première région cause une abolition de l'activité PTPase chez le lapin. La délétion de la première moitié de la région 2 diminue l'activité de sept fois et l'enlèvement de la deuxième moitié réduit l'activité de 400 fois. Si la protéine est tronquée à partir de la troisième région conservée, plus aucune activité PTPase n'est observée (Van Hoof et al., 1998).

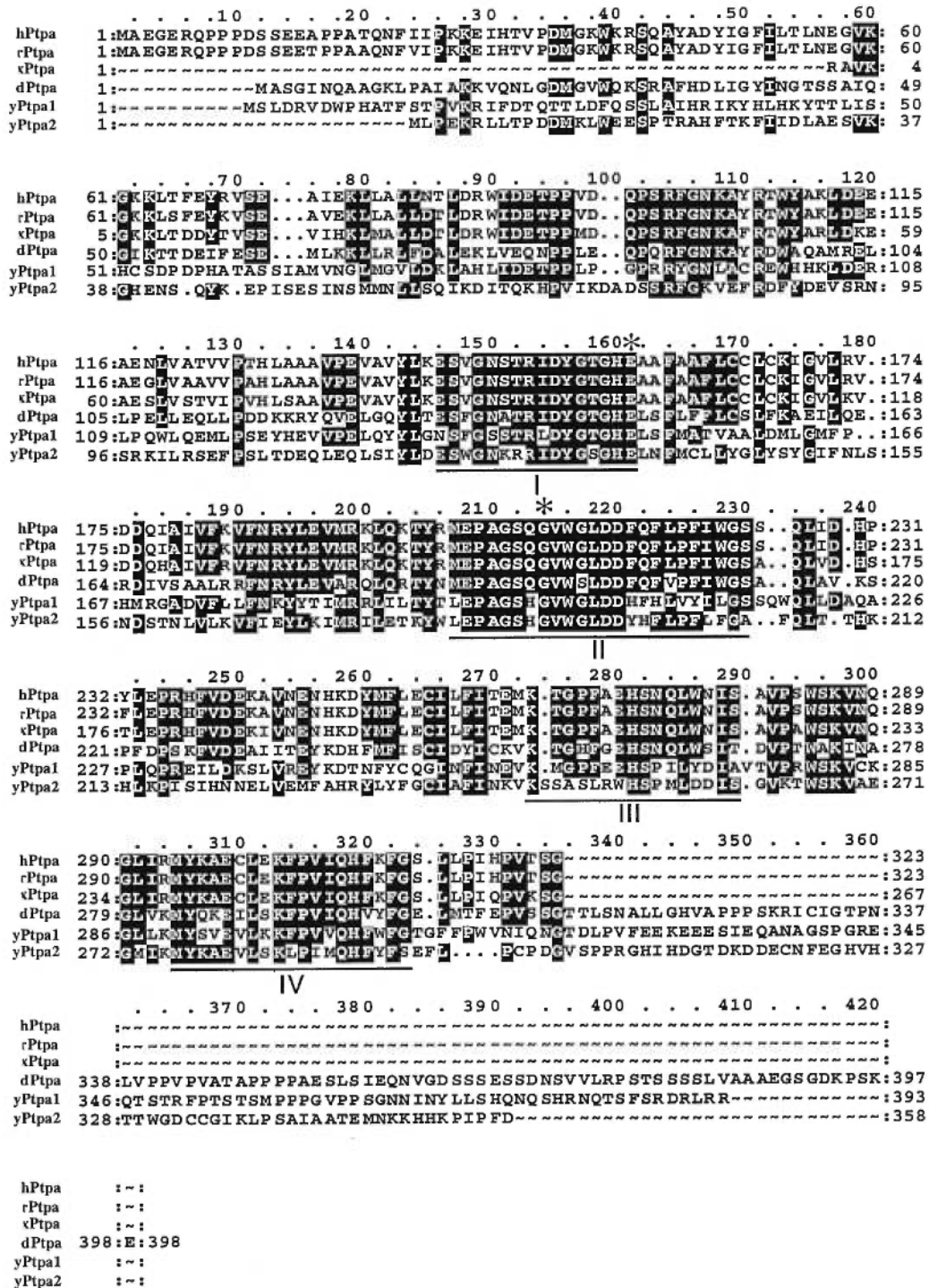


Figure 25: Aligment de la structure primaire de PTPA à travers l'évolution. Les séquences protéiques utilisées sont: Ptpa humain (A54021), Ptpa du lapin (B54021). Ptpa du xénope tiré de Van Hoof et al., 1998, Ptpa de la drosophile (CAA67051), Ptpa1 de *S. cerevisiae* (P40454) et Ptpa2 de *S. cerevisiae* (CAA97857). Les boîtes indiquent que les acides aminés

sont identiques dans au moins 66% des séquences analysées. Les astérisques dénotent les mutations E149K et G200D des mutants de *yptpa1*.

Le séquençage du gène *yptpa1* du plasmide pIB12 obtenu par mutagénèse aléatoire a révélé que la première mutation (E149K) rencontrée était dans la région conservée numéro 1. Cette mutation a été par la suite isolée dans le plasmide pIB13. Il s'agit du troisième avant-dernier acide aminé (glutamate) changé en lysine, soit un acide aminé acide pour un basique. Ce seul changement prévient yPtpa1p d'interagir avec Ydj2p, mais n'affecte en rien la capacité de yPtpa1p d'agir contre les dommages causés par le 4-NQO, situation également retrouvée chez les mutants pIB15 et pIB16. Il s'agit donc d'une partie essentielle pour le contact entre les deux protéines. Le contexte de cet acide aminé, lorsque retrouvé dans la séquence native de yPtpa1p est de 4 acides aminés hydrophiles, un basique, un acide (le glutamate) suivi d'une série d'acides neutres. L'effet de repoussement que peuvent avoir deux acides aminés basiques, dans la séquence modifiée peut faire en sorte de changer la conformation de la protéine, assez pour l'empêcher d'interagir avec Ydj2p, mais sans pour autant changer sa fonction face à la défense cellulaire contre le 4-NQO. Dès maintenant, et avec les autres preuves apportées ci-après, on peut dire que l'interaction liant l'activateur de phosphatase et la chaperone ne concerne pas la fonction de yPtpa1p dans la réparation de l'ADN.

yptpa1 du plasmide pIB14 contient la deuxième mutation de pIB12, G200D. Cette mutation change une glycine (hydrophile) en aspartate (acide). Dans le contexte séquentiel, ce changement met côte-à-côte un acide aminé basique avec un acide. Cette déformation de la région conservée 2 maintient l'interaction yPtpa1p-Ydj2p, mais prévient la fonction de yPtpa1p qui n'est plus capable de compléter un mutant $\Delta yptpa1$ soumis à un traitement au 4-NQO. Cette région aurait donc une importance au niveau du rôle qu'a yPtpa1p dans la cellule, soit au niveau de la réparation de l'ADN.

La différence que prend yPtpa1p dans sa fonction contre le 4-NQO ou encore son interaction avec Ydj2p nous porte à croire que yPtpa1p aurait plus d'une fonction dans la cellule. Une des fonctions connues serait sa relation avec le 4-NQO et les UVA. Une autre fonction probable (ayant un lien ou non avec le rôle présumé d'activateur de phosphatase) requerrait une interaction avec Ydj2p.

4.5 Localisation cellulaire de yPtpa1p et Ydj2p

Par microscopie de fluorescence, nous avons pu établir la localisation des deux protéines d'intérêt et ainsi, cette même localisation peut nous donner des indications sur la fonction propre de ces protéines. L'activateur de phosphotyrosyl phosphatase yPtpa1p se retrouve de façon diffuse dans le cytoplasme ou près de la membrane. Ceci corrobore ce qu'avait déjà trouvé l'équipe de Goris (1994), notant que hPtpa ne se retrouvait pas dans les extraits nucléaires de foie (Van Hoof et al., 1994). Ils dénotent, par contre, que puisque leurs cellules étaient complètement différenciées et stationnaires en phase G₀, il pourrait être possible que dans d'autres phases du cycle cellulaire, dans d'autres tissus ou encore à d'autres stades de développement, hPtpa1 pourrait être nucléaire (Van Hoof et al., 1994). Malgré les traitements au 4-NQO ou encore suite à des chocs thermiques, la distribution cellulaire de yPtpa1p ne change pas, ce qui nous laisse présager un rôle exclusivement de transmission de signal cytoplasmique.

En ce qui concerne la chaperone Ydj2p, elle se retrouve majoritairement dans le noyau, mais peut-être un peu aussi au cytoplasme. L'interaction oeuvrant entre les protéines yPtpa1p et Ydj2 se retrouverait donc dans le cytoplasme de façon physiologique et nous pouvons en déduire que Ydj2p n'aurait pas le rôle d'importer yPtpa1p au noyau pour accomplir sa fonction, mais aurait plutôt un rôle dans la conformation qu'adopte yPtpa1p dans le cytoplasme. Il est intéressant de voir qu'une interaction entre yPtpa1p, une protéine potentiellement cytoplasmique, et Ydj2p, une protéine nucléaire, ait été observée en double-hybride. Nous croyons que yPtpa1p a été importée au noyau grâce à la surexpression de la protéine et également au signal de localisation nucléaire de Gal4p facilitant une interaction yPtpa1p-Ydj2p.

Nous avons pu déterminer la localisation de ces protéines avec un système surexprimant les protéines Imp2p, yPtpa1p et Ydj2p. En effet les gènes correspondants ont été placés sous le contrôle du promoteur Gal1 qui induit une transcription intense et également dans un plasmide à multiples copies. Dans tous les cas, la localisation observée n'est pas exclusive à un compartiment cellulaire et ceci est sûrement dû à la surexpression des protéines d'intérêt. Par exemple, dans le cas de Ydj2p, on la retrouve majoritairement dans le noyau mais aussi au cytoplasme. Une meilleure approche pour avoir un effet plus représentatif de ce qui se passe dans la cellule serait de mettre ces gènes fusionnés à la GFP sous le contrôle de leur propre promoteur, dans un plasmide centromérique ou intégré dans le chromosome de la levure.

4.6 Délétion du gène *ydj2* pour voir ses fonctions chez la levure

Les mutants de délétion de la chaperone Ydj2p ont tout d'abord été essayés dans des cellules haploïdes, sans succès, puis ensuite dans des cellules diploïdes. Les premiers essais ne se sont conclus que par des échecs n'ayant pas de transformant ou ayant de l'intégration multiple dans des locus inconnus. Il devient évident maintenant, à la lumière des ces résultats, d'analyser ces données et de conclure que le gène *YDJ2* est essentiel à la survie des cellules. Lorsque le plasmide intégratif s'incorporait dans le bon gène, il en découlait une mortalité de cette même cellule et voilà donc pourquoi aucun transformant ne pouvait être récupéré. La preuve formelle du caractère essentiel du gène *YDJ2* serait divulgué par la dissection de tétrades.

Des 16 homologues des chaperones DnaJ de levure, un seul présente ce phénotype, soit de la létalité lorsque délété dans des cellules haploïdes. Il s'agit de la chaperone Sis1p (Luke et al., 1991). Comme on l'a vu dans la section sur la GFP, cette protéine fait de la translocation au noyau comme semblerait le faire Ydj2p suite aux conclusions amenées par la GFP. La raison expliquant pourquoi ce gène semble si essentiel pour la levure est encore inconnue. La chaperone interagit probablement avec des protéines du cycle cellulaire ou encore de la machinerie transcriptionnelle qu'il est vital de conserver en bon état pour maintenir la levure en vie.

Le mutant *ydj2^{+/−}* n'est pas un mutant dominant puisque la croissance de cette souche est parfaitement normale. Ce mutant n'est aucunement sensible aux effets du 4-NQO (résultat non-présenté). La question demeure ouverte à savoir si la chaperone pourrait avoir un rôle à jouer dans la survie des cellules face aux rayons UVA. Aucune publication n'a été faite dans la littérature comme quoi les chaperones pouvaient être stimulées par les UVA à l'exception d'une faible stimulation de HSP-70 et HSP-104 dans des fibroblastes de peau (Keyse and Tyrrell, 1987; Ryter and Tyrrell, 1998). La fonction exacte de Ydj2p dans la cellule est énigmatique. Une des façons d'en connaître un peu plus serait de chercher des partenaires qui ont besoin du contact avec Ydj2p pour accomplir leur rôle cellulaire et ce, par double-hybride ou moyens biochimiques. Également la création d'un mutant conditionnel pourrait permettre de découvrir bien des voies menant à la compréhension du rôle joué par *YDJ2* dans la cellule.

V. CONCLUSION

Le but de cette étude était d'approfondir nos connaissances sur le gène *yPTPA1*. Il s'agit de l'homologue du gène humain *hPTPA* qui est un activateur de phosphotyrosyl phosphatase de la famille des PP2A. Des données précédentes nous informaient que la délétion du gène conférait une sensibilité à la drogue 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) agent préalablement connu comme mimant l'action des UVC (254nm). Sachant que le mutant $\Delta yptpa1$ n'était pas sensible à ce type d'ultraviolet, les recherches afin de connaître quelles lésions étaient nocives pour un tel mutant furent entreprises.

Puisque le 4-NQO provoque également des dommages oxydatifs en plus des dommages encombrant l'ADN, d'autres sources d'oxydants furent vérifiées afin de distinguer cette possibilité. Il s'est avéré que seulement les ultraviolets de type A entraînent une sensibilité similaire au 4-NQO du mutant. Nos résultats suggèrent que la sensibilité au 4-NQO du mutant $\Delta yptpa1$ est médiée par les dommages oxydatifs plutôt que les lésions encombrantes. Le mutant $\Delta yptpa1$ est donc un outil intéressant pour la dissociation des deux types de lésions causés par le 4-NQO. Les UVA sont une puissante source de dommages oxydatifs et ont un rôle important à jouer dans le développement des cancers de la peau dans la population caucasienne. En établissant que *yPTPA1* est impliqué dans la résistance des cellules face aux UVA et que ces données peuvent être extrapolées aux cellules humaines, on ouvre la porte à une éventuelle protection de la peau contre les dommages nuisibles du bronzage.

En se fiant au rôle de *hPTPA* chez l'humain et en supposant une homologie de fonction également, nous avons voulu savoir quelle phosphatase était activée par yPtpa1p. Par double-hybride, nous avons récupéré une chaperone fortement homologue à Ydj1p que nous avons appelé Ydj2p. Cette chaperone, inconnue jusqu'alors est essentielle à la survie cellulaire puisqu'un mutant haploïde n'est pas viable. Par microscopie à fluorescence, nous avons pu déterminer la localisation cellulaire des deux protéines d'intérêt. yPtpa1p se retrouve dans le cytoplasme tandis que Ydj2p est vu dans le noyau et un peu dans le cytoplasme. Pour nous indiquer si l'interaction entre yPtpa1p et Ydj2p survient dans le but de résister aux agressions du 4-NQO, une mutagenèse aléatoire fut entreprise. Les données recueillies nous disent que les deux prémices sont dissociables puisqu'un mutant *yptpa1* confère la résistance au 4-NQO, mais n'est plus capable d'interagir avec la chaperone. La fonction exacte de l'interaction yPtpa1p-Ydj2p n'est pas claire et encore beaucoup de travail reste à faire pour comprendre de façon certaine les voies de signalisation.

En résumé, illustré en figure 26, un modèle hypothétique basé sur notre connaissance présente des protéines yPtpa1p et Ydj2p. yPtpa1p est une protéine multifonctionnelle à la fois

impliquée dans la réparation de l'ADN endommagé au 4-NQO ou aux UVA ou dans une fonction cellulaire inconnue jusqu'à présent par son interaction avec Ydj2p. Le rôle de yPtpa1p dans la réparation de l'ADN pourrait être effectué via l'activation d'une phosphatase ou directement via une fonction inconnue. yPtpa1p peut également interagir avec Ydj2p dans le cytoplasme ce qui pourrait i) résulter en une fonction inconnue ii) permettre un changement de localisation cellulaire iii) permettre une activation d'une phosphatase, iv) permettre un changement de conformation. Les hypothèses résultent en une fonction inconnue.

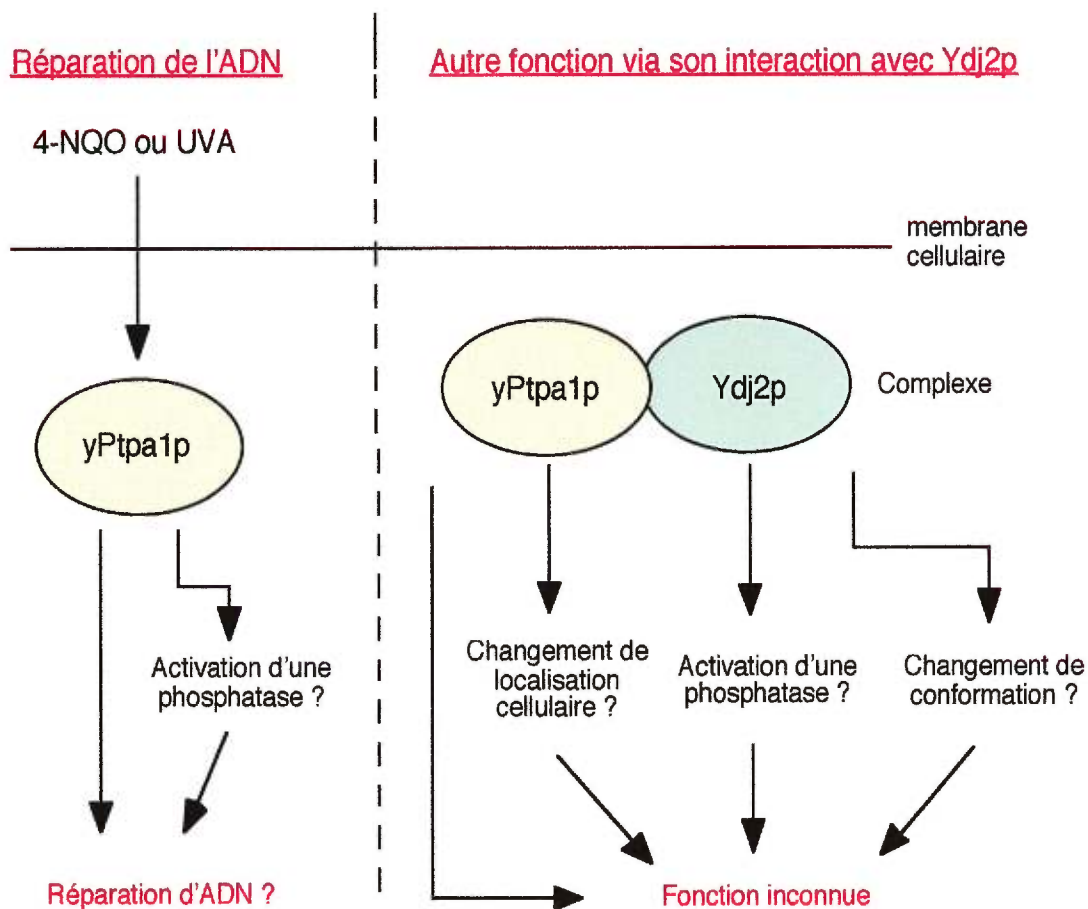


Figure 26: yPtpa1p, une protéine multifonctionnelle à la fois impliquée dans la réparation de l'ADN endommagé au 4-NQO ou aux UVA ou dans une fonction cellulaire inconnue jusqu'à présent par son interaction avec Ydj2p

VI. ANNEXE I

A Yeast Homologue of the Human Phosphotyrosyl Phosphatase Activator PTPA Is Implicated in Protection against Oxidative DNA Damage Induced by the Model Carcinogen 4-Nitroquinoline 1-Oxide*

(Received for publication, January 13, 1998, and in revised form, May 1, 1998)

Dindial Ramotar‡, Edith Belanger, Isabelle Brodeur, Jean-Yves Masson, and Elliot A. Drobetsky

From the Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Centre de Recherche, Université de Montréal, Montréal, Québec H1T 2M4, Canada

The model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) has historically been characterized as "UV-mimetic" with respect to its genotoxic properties. However, recent evidence indicates that 4-NQO, unlike 254-nm UV light, may exert significant cytotoxic and/or mutagenic potential via the generation of reactive oxygen species. To elucidate the response of eukaryotic cells to 4-NQO-induced oxidative stress, we isolated *Saccharomyces cerevisiae* mutants exhibiting hypersensitivity to the cytotoxic effects of this mutagen. One such mutant, EBY1, was cross-sensitive to the oxidative agents UVA and diamide while retaining parental sensitivities to 254-nm UV light, methyl methanesulfonate, and ionizing radiation. A complementing gene (designated *yPTPA1*), restoring full UVA and 4-NQO resistance to EBY1 and encoding a protein that shares 40% identity with the human phosphotyrosyl phosphatase activator hPTPA, has been isolated. Targeted deletion of *yPTPA1* in wild type yeast engendered the identical pattern of mutagen hypersensitivity as that manifested by EBY1, in addition to a spontaneous mutator phenotype that was markedly enhanced upon exposure to either UVA or 4-NQO but not to 254-nm UV or methyl methanesulfonate. Moreover, the *ytpa1* deletion mutant exhibited a marked deficiency in the recovery of high molecular weight DNA following 4-NQO exposure, revealing a defect at the level of DNA repair. These data (i) strongly support a role for active oxygen intermediates in determining the genotoxic outcome of 4-NQO exposure and (ii) suggest a novel mechanism in yeast involving *yPtpa1p*-mediated activation of a phosphatase that participates in the repair of oxidative DNA damage, implying that hPTPA may exert a similar function in humans.

Treatment with the agent 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)¹ has been widely employed in mammalian systems as a paradigm for DNA damage-induced carcinogenesis. To exert its neoplastic effect, 4-NQO must first undergo metabolic activation to the proximate carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, which, following acylation, reacts with DNA to form

stable quinoline-purine monoadducts, *i.e.* at the exocyclic N-2 and N-6 positions of guanine and adenine, respectively (1, 2). In bacteria, yeast, and mammalian cells, these genotoxic "bulky" DNA lesions are processed largely by the nucleotide excision repair (NER) pathway in a manner analogous to classical dipyrimidine photoproducts (*viz.* cyclobutane pyrimidine dimers and (6–4) pyrimidine-pyrimidone photoproducts) generated by the model DNA-damaging agent 254-nm UV light (3, 4). As such, mutants that are deficient in NER are hypersensitive to the genotoxic effects of 254-nm UV light, as well as 4-NQO (3–6). The apparent strong similarity in modes of cellular processing for 254-nm UV light- and 4-NQO-induced DNA damage in diverse prokaryotic and eukaryotic systems has often resulted in categorization of the latter agent as "UV-mimetic" (7).

However, this designation may be inappropriate, because several recent investigations have clearly demonstrated that 4-NQO, unlike 254-nm UV light, can generate a substantial degree of intracellular oxidative stress. This may herald significant consequences for 4-NQO-exposed cells at the level of cell killing and mutagenesis. Indeed, it was shown that 4-NQO is a potent inducer of the *Escherichia coli* *soxRS* regulon that responds to intracellular superoxide imbalances (8). It is believed that 4-NQO undergoes redox cycling to produce superoxide anion, which can be further converted into genotoxic reactive oxygen species (*e.g.* singlet oxygen and hydroxyl radicals) that engender modified bases and DNA strand breaks (8, 9). In fact, it has been shown *in vitro* that activated 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide can generate the highly premutagenic product 8-oxo-guanine, as well as strand breaks, in the presence of Cu(II) (9, 10). In *E. coli*, 8-oxoguanine is removed by the formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg), which in turn generates apurinic (AP) sites as secondary lesions (11). AP sites are also highly premutagenic but can be efficiently removed from cellular DNA by AP endonucleases (12, 13). It is therefore not surprising that bacterial mutants lacking either Fpg or AP endonucleases are hypersensitive to the mutagenic effects of 4-NQO (but not of 254-nm UV light) (8, 14).

Based on the demonstrated ability of 4-NQO to induce oxidative stress that contributes to cell killing and mutagenesis in bacteria, we postulated that this agent may act similarly in eukaryotic cells. As such, using the model organism *Saccharomyces cerevisiae*, the aim of the present investigation was to identify novel eukaryotic genes implicated in the cellular response to 4-NQO-induced oxidative DNA damage. Our strategy involved, sequentially (i) isolation of a large panel of yeast mutants exhibiting hypersensitivity to the cytotoxic effects of 4-NQO, (ii) categorical preclusion from further analysis of any mutants showing full cross-sensitivity to 254-nm UV light,

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom correspondence should be addressed: Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Centre de Recherche, Université de Montréal, 5415 Boul. de l'Assomption, Montréal, PQ H1T 2M4, Canada. Tel.: 514-252-3400, Ext. 4684; Fax: 514-252-3430.

¹ The abbreviations used are: 4-NQO, 4-nitroquinoline 1-oxide; NER, nucleotide excision repair; AP, apurinic; MMS, methyl methanesulfonate; kb, kilobase(s).

because these are likely to carry mutations in previously identified DNA repair genes, e.g. comprising the NER pathway known to participate in the processing of UV-type dipyrimidine photoproducts, as well as classical 4-NQO-induced bulky DNA adducts, and (iii) appropriate characterization of any remaining mutants expressing putative defects specifically in the processing of 4-NQO-induced oxidative DNA damage. In this manner, we identified a novel 4-NQO-sensitive yeast mutant that retains parental resistance to 254-nm UV light, while displaying certain hallmarks consistent with a deficiency in the repair of oxidative DNA lesions. A gene complementing this defective phenotype was isolated from a yeast genomic library, and was shown to correspond to a previously identified, but functionally uncharacterized, yeast gene with a predicted amino acid sequence that manifests significant identity with the human phosphotyrosyl phosphatase activator hPTPA. Our data strongly support a genotoxic role for reactive oxygen species in 4-NQO-exposed yeast, and provide novel *in vivo* evidence for the participation of cellular phosphatases in the repair of oxidative DNA damage in eukaryotic cells.

MATERIALS AND METHODS

Strains, Media, Genetic Analysis, and Transformation—The wild type *S. cerevisiae* strains used in this study were DBY747 (*MAT α* , *leu2-3*, *112*, *his3- Δ 1*, *trp1-289a*, *ura3-52*, laboratory stock), DBY747-1 (isogenic to DBY747, except *trp1::hisG*), W303a (*MAT α* , *ade2-1*, *his3-11*, *leu2-3*, *112*, *trp1-1*, *ura3-1*, provided by Dr. M. Stark, University of Dundee, UK), FY86 (*MAT α* ; *his3 Δ 200*, *ura3-52*, *leu2 Δ 1*, provided by Dr. Fred Winston, Harvard University), and MKp-o (*MAT α* , *can1-1000*, *ade2-1*, *lys2-1*, *ura3-52*, *leu2-3*, *112*, *his3 Δ 200*, *trp1- Δ 901*, provided by Dr. Bernard Kunz, Deakin University, Australia). The mutant strain EB1 is isogenic to DBY747, except that it bears a mutated copy of the *yPTPA1* gene (see below). EB2, EB3, and EB4 were derived, respectively, from DBY747-1, MKp-o, and W303a by deleting a portion of the *yPTPA1* coding region and replacing it with the selective marker *LEU2* (see below). Likewise, CHY26 and CHY27 were derived, respectively, from DBY747-1 and EB2 by deleting a portion of the coding region of the *yPTPA2* gene and replacing it with the selective marker *TRP1* (see below). The yeast strains DEY10-2C (isogenic to W303a, except *pph2 Δ 1::URA3*), DEY142-4D (isogenic to W303a, except *MAT α* , *pph2 Δ 1::HIS3*), and DEY22-12 (isogenic to W303a, except *pph2 Δ 1::HIS3*, *pph22-12*) were all generously provided by Dr. M. Stark (University of Dundee, UK). Yeast cells were grown in either complete yeast peptone dextrose (YPD) or minimal synthetic (SC) medium, to which nutritional supplements were added at 20 μ g/ml (15). Standard genetic analysis and transformation were carried out as described previously (16, 17). The *E. coli* strain used for plasmid maintenance was HB101.

Isolation of Mutants Hypersensitive to 4-NQO—Exponentially growing wild type yeast (strain DBY747) were treated with 0.1% MMS for 1 h, and surviving colonies were streaked onto YPD agar plates containing 0.4 μ g/ml of 4-NQO. This drug concentration permits 90–95% growth of wild type, and strains that did not sustain growth at this drug concentration were scored as mutant.

Construction of the *ytpa1* and *ytpa2* Deletion Mutants—A 1.5-kb *SmaI/HindIII* yeast DNA fragment bearing the *yPTPA1* coding region and flanking 5'- and 3'-untranslated regions was derived from pDR1022 (see below) and subcloned into the pBluescript vector K/S to produce the plasmid pIV3. This plasmid was digested with *SalI/PstI* to release a 125-base pair fragment from within the coding region of the *yPTPA1* gene. The released fragment was substituted with the *S. cerevisiae* *LEU2* selective marker, which was obtained as a 2.5-kb *SalI/PstI* fragment from the plasmid YEp13 (16), to produce plasmid pTV4. A linear 3.2-kb fragment, *ytpa1 Δ ::LEU2*, was obtained from pTV4 by digestion with *HindIII* and *ScaI* and transformed directly into the wild type haploid strains DBY747, FY86, and MKp-o using the lithium acetate procedure (17). *Leu2⁺* transformants bearing a chromosomal deletion of the *yPTPA1* gene were verified by Southern blot analysis (16), using a ³²P-labeled 1.0-kb fragment of the *yPTPA1* coding region as probe. To construct a *ytpa2* deletion mutant, the entire *yPTPA2* gene was first isolated from strain DBY747 by polymerase chain reaction amplification using the upstream (5'-TCTTTTAAAGCTTAA-GAAAATCG-3') and downstream (5'-GGAAAAGTACGTACCG-3') primers containing the restriction sites *HindIII* and *SnaBI* (18). These

primers amplified a 1.9-kb *HindIII/SnaBI* DNA fragment, which was then subcloned into pBluescript digested with *HindIII* and *SmaI* to produce pCH1. pCH1 was in turn digested with *EcoRI*, which removes 160 nucleotides from the N-terminal end of the *yPTPA2* coding region, and a 1.2-kb *EcoRI* fragment containing the *TRP1* selective marker gene was inserted at the *EcoRI* site to produce pCH2. Digestion of pCH2 with *HindIII* and *BamHI* produced the *ytpa2 Δ ::TRP1* 3.0-kb DNA fragment, which was transformed into strains DBY747 and EB2. *ytpa2* deletion mutants were confirmed by Southern blot analysis.

Survival Curves—The sensitivities of the various yeast strains to 4-NQO, diamide, and methyl methanesulfonate (all purchased from Sigma) were measured using exponential phase cultures. Overnight cultures grown to saturation at 30 °C in YPD were diluted into fresh medium at an A_{600} of 0.2 ($\sim 2 \times 10^6$ cells/ml) and incubated to an A_{600} of 1.0. Aliquots were then treated with various concentrations of drugs at 30 °C with shaking (250 rpm) for 1 h. Relative survival was determined by immediately diluting the samples in sterile 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and plating onto YPD agar. Colonies were counted after 3–4 days of growth at 30 °C. In the case of γ -irradiation treatment, exponential cells were irradiated in cold YPD medium using a Co⁶⁰ source at a dose rate of 55.5 rad/s (experiments carried out in the laboratory of Dr. Michael Resnick, NIEHS, NIH).

For exposure to defined regions of the UV wavelength spectrum, mid-log phase yeast were irradiated in sterile distilled water using fluorescent 25-W lamps emitting either UVA (GE model F25T8-BL), UVB (Spectrolite model XX25B), or 254-nm UV light (GE model G25T8). Cells were treated at relatively low density (10^5 cells/ml in 35-mm Petri dishes) and with constant shaking to avoid cellular shielding. The incident light was rigorously purified using 2-mm-thick glass filters (Schott, Mainz, Germany) to virtually eliminate contaminating wavelengths below 290 nm in the case of UVB (filter WG 305) and below 320 nm for UVA (filter WG 345). The incident UVB ($\lambda > 290$ nm), UVA ($\lambda > 320$ nm), and 254-nm UV light dose rates were measured using a Spectrolite DRC 100X digital radiometer equipped with DIX 300, DIX 365, and DIX 254 sensors, respectively.

Gradient Plate Assay—This assay was performed as described previously (19). Briefly, cells were replicated as a thin line along the drug gradient, and after 2 days of growth at 30 °C the distance of growth of each strain is expressed as a percentage of the wild type. Growth all along the gradient is considered to be 100%.

Mutation Rate Assay—Spontaneous mutation rates were determined using a fluctuation test as described previously (20). The measurement of the drug-induced mutation rate was done by directly adding the appropriate concentration of drug to the selective medium. For UVA treatment, a 24-well plate containing the culture was irradiated with UVA 2 days after the cells were exhausted of adenine, by which time they had grown from an initial inoculum of $\sim 5,000$ to a final density of $\sim 1.0 \times 10^6$ cells.

Alkaline Sucrose Density Gradient—Chromosomal DNA from either untreated or 4-NQO-treated cells were isolated and analyzed as described previously (21).

Plasmids—The plasmids pEB1 and pEB2 were constructed by subcloning the 1.5-kb *SmaI/HindIII* DNA fragment carrying the *yPTPA1* gene into the single copy vector YCplac33 and the 2 μ multicopy vector YEplac195, respectively, cut with *SmaI* and *HindIII* (22). Similarly, the plasmids pEB3 and pEB4 were constructed by subcloning the 1.9-kb *HindIII/SnaBI* polymerase chain reaction fragment of the *yPTPA2* gene into YCplac33 and YEplac195, respectively, also cut with *HindIII* and *SmaI*. The multicopy plasmids pPPH21 and pPPH22, respectively, bearing the entire *PPH21* and *PPH22* genes were provided by Dr. M. Stark.

Northern Blot—Total RNA was prepared by the rapid glass bead method (23). The nitrocellulose blot was probed with a random primed ³²P-labeled 1.1-kb *HindIII/SnaBI* fragment derived from the coding region of the *yPTPA1* gene.

Construction of *yPTPA1* Promoter Fusion to *lacZ*—The primers, 5'-CCCTGTGGCCGAATTCATCTGCTC-3' and 5'-ATCTACAGGATCCAGAGACAT-3' containing, respectively, the restriction sites *EcoRI* and *BamHI* (underlined), were used to amplify a 632-base pair fragment consisting of the promoter region of *yPTPA1* gene from -615 to +17 base pairs. The *EcoRI/BamHI* fragment was subcloned into the multicopy vector YEP356R (provided by Dr. Fred Winston, Harvard Medical School, Boston, MA), such that the ATG start codon of the *yPTPA1* gene forms the initiation codon for the *E. coli* reporter *lacZ* gene encoding β -galactosidase.

DNA Sequence Analysis—To determine the location of the mutation in the *yPTPA1* gene derived from the mutant EB1, the primers 5'-CCCTGTGGCCGAATTCATCTGCTC-3' and 5'-TAATGCTGGGAT-

Yeast Tolerance to 4-NQO

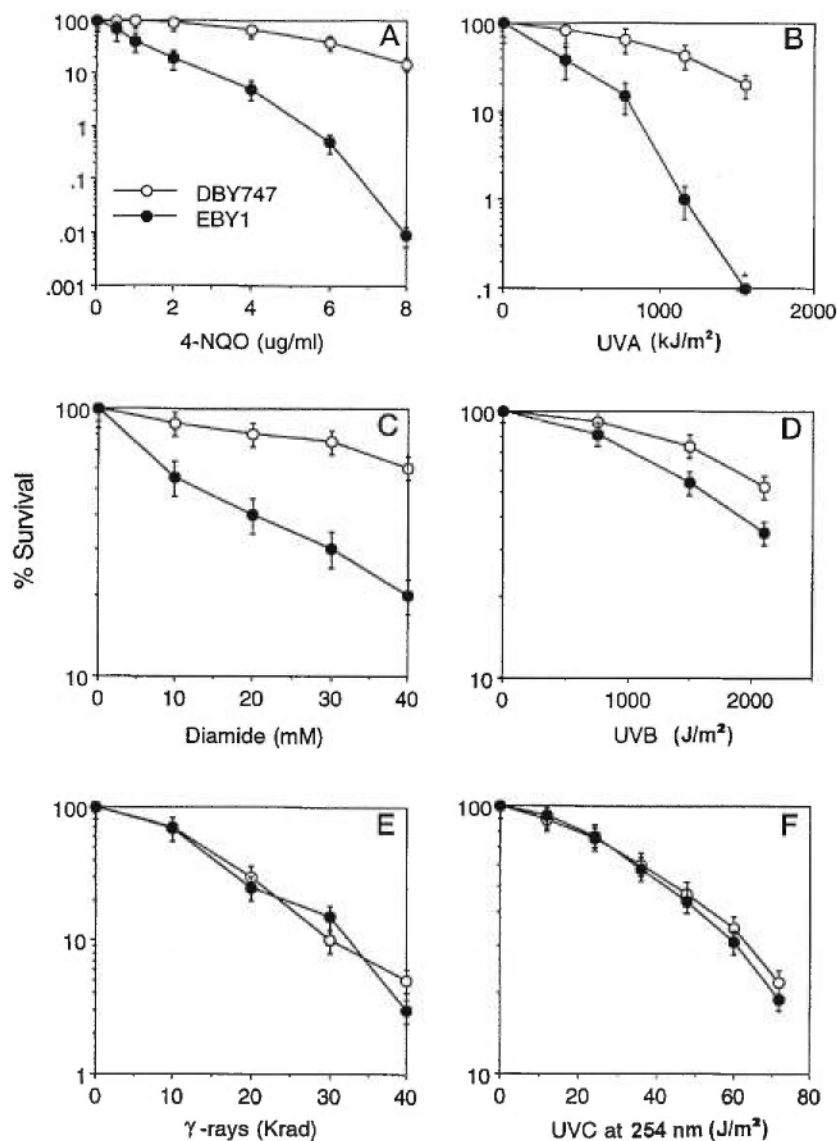


FIG. 1. Sensitivities of *S. cerevisiae* wild type and mutant strains to various mutagens. Points represent the mean of two independent determinations. Open circle, DBY747 (wild type); closed circle, EBY1 (*ytpa1* mutant).

CCACATTTATA-3' were used to isolate a 1.5-kb DNA fragment of the *yPTPA1* gene, with the underlined *EcoRI/BamHI* sites, respectively, from strain EBY1 carrying the mutant allele. The fragment was subcloned into pBluescript, and only one strand of the mutant allele of the *yPTPA1* gene was entirely sequenced by the dideoxy chain termination method (24). All additional DNA fragments isolated by polymerase chain reaction were also sequenced by this method.

RESULTS

Characterization of Yeast Mutants Hypersensitive to 4-NQO—In an attempt to identify novel eukaryotic genes implicated in the repair of 4-NQO-induced oxidative DNA damage, a panel of 55 *S. cerevisiae* mutants exhibiting hypersensitivity to the cytotoxic effects of this agent was initially isolated. Fifty of the mutants among this collection were excluded from further analysis, because they displayed strong cross-sensitivity to 254-nm UV light, *i.e.* reflecting the UV-mimetic character of 4-NQO, therefore indicating the involvement in the observed 4-NQO hypersensitivity of previously identified genes comprising, *e.g.* the NER pathway (3–5). The remaining five 4-NQO-sensitive mutants all retained parental resistance to 254-nm UV light and MMS and were therefore deemed potentially deficient in the processing of oxidative DNA damage. One of these 4-NQO-sensitive, 254-nm UV light-resistant mutants,

designated EBY1, was shown to be highly cross-sensitive to the oxidizing agents UVA (320–400 nm) and diamide (Fig. 1). Moreover, EBY1 displayed only marginal sensitivity to UVB (290–320 nm), which has a much smaller oxidative component relative to UVA (Fig. 1), as well as to hydrogen peroxide (data not shown). Finally, EBY1 also manifested parental resistance to ionizing radiation (Fig. 1) and bleomycin (data not shown), providing evidence that it is not defective in the Rad52 recombinational/double-strand break repair pathway (25).

The mutation conferring 4-NQO and UVA sensitivity to EBY1 was recessive, because a diploid strain constructed by crossing EBY1 (*MAT α*) with a wild type strain FY86 (*MAT α*) showed wild type resistance to 4-NQO (data not shown). Dissection of eight tetrads derived by sporulating the diploid EBY1 X FY86 produced 2:2 segregation of the 4-NQO sensitivity in the progeny, indicating that EBY1 carries a single mutation.

The EBY1-complementing Gene, Designated *yPTPA1*, Is a Yeast Homologue of the Human Phosphatase Activator *hPTPA*—Because UVA, 4-NQO, and diamide all generate free radicals, we reasoned that the hypersensitivity of EBY1 to these agents may be because of a defect in a pathway that signals the repair of, or itself repairs, oxidatively damaged

Yeast Tolerance to 4-NQO



FIG. 2. Comparison of the predicted amino acid sequence between *S. cerevisiae* yPTPA1p and human PTPA. The four highly conserved regions (I, II, III, and IV) shown in boxes are also present in yPtpa2p and in proteins predicted from related genes found in other species (see text).

DNA. Furthermore, the fact that the mutagen-hypersensitive phenotype of EB1 was clearly distinct from that of other known yeast DNA repair-deficient mutants suggested that this strain may harbor a mutation at an uncharacterized locus. To isolate the complementing gene, a yeast genomic library constructed in the single copy vector YCp50, and bearing the *URA3* selective marker, was introduced into strain EB1. At least 10,000 Ura⁺ colonies were replica plated onto YPD agar containing 0.4 μ g/ml of 4-NQO, a drug concentration that completely suppressed growth of the mutant but not the parental strain. Two Ura⁺ colonies, EB1/pDR1022 and EB1/pDR1023, were found to be resistant to 4-NQO and UVA (data not shown). The plasmids isolated from the two independent Ura⁺ colonies were identical, because each contained a 12-kb DNA fragment bearing the same restriction enzyme pattern. The portion of the pDR1022 plasmid that conferred 4-NQO or UVA resistance to strain EB1 was traced to a 1.5-kb *Sma*I/*Hind*III DNA fragment derived from chromosome IX. The fragment contained a single open reading frame (designated *YIL153w* in accordance with the *S. cerevisiae* gene data base nomenclature) and predicted to encode a polypeptide of 394 amino acids in length. Comparison with protein sequences in the GenBankTM data base revealed that *YIL153w* encodes a protein that shares 31, 54, 38, and 40% identity with proteins encoded by, respectively, a *S. cerevisiae* gene *yPL152w* (accession number z73508), a fission *Schizosaccharomyces pombe* gene (accession number z98980), a *Drosophila* gene (accession number x98401), and the human PTPA (hPTPA) gene (accession number x73478) (26). This latter gene encodes the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA that modulates the weak tyrosyl phosphatase activity of PP2A (26, 27). For simplicity, we refer to the yeast genes *YIL153w* and *YPL152w* as *yPTPA1* and *yPTPA2* and the encoded proteins as yPtpa1p and yPtpa2p, respectively. No homologue of yPtpa1p has yet been isolated from prokaryotic cells. A detailed comparison between *S. cerevisiae* yPtpa1p and human hPTPA1 is shown in Fig. 2. These proteins share four highly conserved regions (I, II, III, and IV) that are also present in yPtpa2p and in the proteins

predicted by the *S. pombe* and *Drosophila* genes, suggesting that they play an important role in cellular metabolism. A computer search for functional motifs revealed that only region II contains the consensus sequence of an ATP binding site (28).

Because yPtpa2p shares significant identity with yPtpa1p, it is possible that the observed phenotype of strain EB1 might also arise from a genetic defect in the *yPTPA2* gene. To test this, we isolated the *yPTPA1* and *yPTPA2* genes from strain EB1 using polymerase chain reaction and subjected both to DNA sequence analysis (18). No alteration was found in the nucleotide sequence of the *yPTPA2* gene, as compared with DNA sequences in the *S. cerevisiae* data base. In contrast, a single base pair substitution was found in the *yPTPA1* gene derived from strain EB1. The mutation was located at codon 60, where TAC was mutated to the TAA stop codon. Thus, the phenotypes associated with EB1 are because of a defective *yPTPA1* gene and not its homologue *yPTPA2*.

yptpa1 Null Mutants Are Hypersensitive to UVA and 4-NQO—To directly confirm that the *yPTPA1* gene is responsible for the observed phenotypes in strain EB1, we replaced a portion of the *yPTPA1* coding region, with the selective marker *LEU2* in the parental strain DBY747. The resulting mutant EB2 (*yptpa1 Δ ::LEU2*) showed identical sensitivity to UVA and 4-NQO, as compared with EB1 (Fig. 3, A and B). Deletion of the *yPTPA1* gene in three additional parent strains FY86, MKp-o, and W303 also produced mutants with marked sensitivities to UVA and 4-NQO (data not shown), eliminating the possibility that the observed phenotypes were strain-specific. Like EB1, none of the deletion mutants showed sensitivities to other DNA-damaging agents including MMS, γ -rays, and 254-nm UV light. Full parental UVA and 4-NQO resistance was restored to EB2 by the single copy centromeric plasmid, pEB1, carrying the entire *yPTPA1* gene (positions -615 to +1400), including its putative promoter, the entire coding region, and 200 nucleotides downstream from the stop codon (Fig. 3, A and B). Increasing *yPTPA1* gene dosage by using a multicopy plasmid pEB2 conferred no further mutagen resistance, suggesting that yPtpa1p is not limiting in the cell

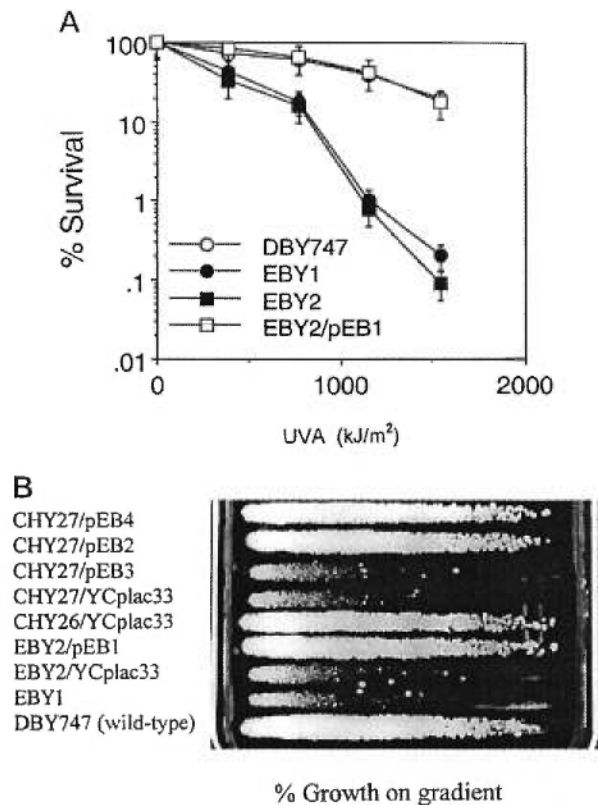


FIG. 3. Resistance of yeast strains to UVA and 4-NQO. **A**, UVA treatment of the indicated strains. **B**, 4-NQO gradient plate assay of the following strains: DBY747 (wild type), EBY1 (mutant), EBY2 (*ytpa1Δ::LEU2*/YCplac33, EBY2/pEB1, HCY26 (*ytpa2Δ::TRP1*)/YCplac33, HCY27 (*ytpa1Δ::LEU2*; *ytpa2Δ::TRP1*)/YCplac33, HCY27/pEB3, HCY27/pEB2, and HCY27/pEB4. The plasmids pEB1 and pEB3 contained, respectively, the entire *yPTPA1* and *yPTPA2* genes inserted into the single copy vector YCplac33, and pEB2 and pEB4 contained, respectively, the entire *yPTPA1* and *yPTPA2* genes inserted into the multicopy vector YEplac195. Growth all along the gradient is taken to be 100% (see "Materials and Methods"). The bottom layer of the gradient contained 15 μ g of 4-NQO.

(Fig. 3B).

Although the above data confirm that *yPtpa1p* is essential for cellular resistance to UVA and 4-NQO, they do not completely exclude a role for *yPtpa2p*. To directly test this, a mutant was constructed by deleting the *yPTPA2* gene from the parent strain DBY747 by replacing it with the auxotrophic marker gene *TRP1*. The resulting mutant CHY26 retained parental resistance to UVA, to 4-NQO, and to other DNA-damaging agents such as MMS (Fig. 3B; data shown only for 4-NQO). Furthermore, a *ytpa1 ytpa2* double mutant CHY27 was no more sensitive to 4-NQO than the single *ytpa1* mutant EBY2 (Fig. 3B). These data confirm that *yPTPA1* and not *yPTPA2* is required for UVA and 4-NQO tolerance. It should also be noted that 4-NQO resistance could not be restored to strain CHY27 by the plasmid pEB3, which bears a single copy of the *yPTPA2* gene (Fig. 3B). Interestingly, however, if the *yPTPA2* gene was inserted into the multicopy vector YEplac195, and the resulting plasmid pEB4 was introduced into strain CHY27, full parental 4-NQO resistance was restored (Fig. 3B). This latter observation may not be surprising in view of the high degree of homology between *yPtpa1p* and *yPtpa2p*, but nonetheless confirms that the endogenous level or activity of *yPtpa2p* is insufficient to compensate for complete loss of *yPtpa1p*.

yPtpa1p Expression Is Not Inducible—To determine whether

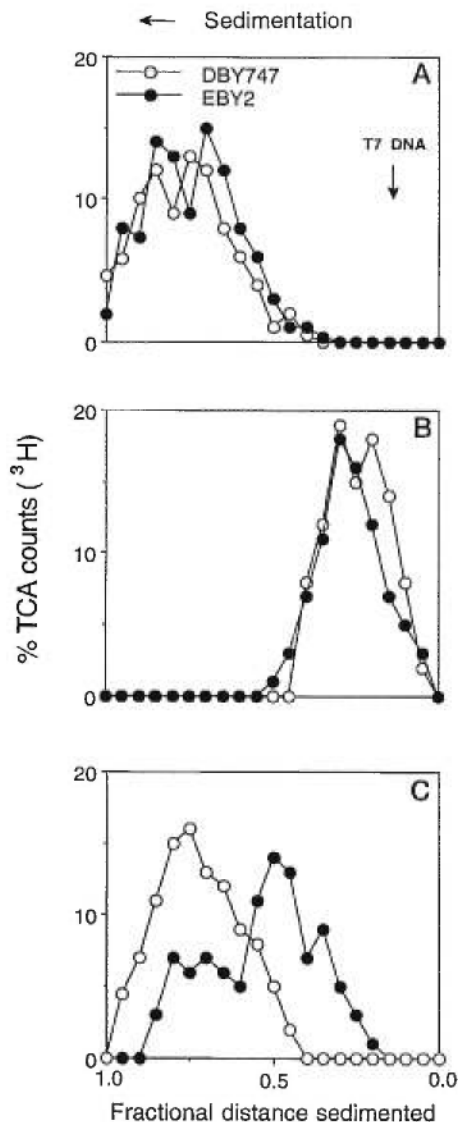


FIG. 4. Analysis of chromosomal DNA damage from 4-NQO-treated *S. cerevisiae* on an alkaline sucrose density gradient. **A**, untreated. **B**, treated with 2.5 μ g/ml of 4-NQO for 1 h. **C**, treated with 4-NQO, washed, and recovered for 8 h in YPD medium. Sedimentation positions of bacteriophage T7 DNA are shown by vertical arrows. TCA, trichloroacetic acid.

yPtpa1p is inducible by cellular stress, the putative *yPTPA1* promoter region (spanning positions -615 to $+1$) was fused to the reporter gene *lacZ*, encoding β -galactosidase. Upon introduction of the fusion plasmid construct into either EBY2 or the wild type strain, each expressed the same basal level of β -galactosidase activity (120 units/mg protein). This activity could not be induced by exposure to either UVA or 4-NQO nor by stress conditions including heat and osmotic shock. It would therefore appear that the endogenous level of *yPtpa1p* is sufficient for its biological function.

The ytpa1 Null Mutant Is Defective in the Recovery of High Molecular Weight DNA Following Treatment with 4-NQO—Mutants deficient in any of the three major DNA repair pathways, *i.e.* the nucleotide excision, post-replicative, and recombinational pathways, show hypermutability in response to a wide spectrum of DNA-damaging agents including 4-NQO. We therefore tested whether the hypersensitivity of EBY2 to 4-NQO might be attributable to a defect in DNA repair. The

TABLE I
Spontaneous and induced mutation rates in the parent and the *ytpa1* Δ mutant

Spontaneous mutation rates were measured at the *ade2-1* allele as described previously (20). The values are the average of three independent determinations.

Treatment	MKP-o	EBY3	Fold increase
	<i>mutation rate / 10⁸ cell/generation</i>		
None	3.4 \pm 0.8	10.9 \pm 1.6	3
UVA (150 kJ/m ²)	4.6 \pm 0.7	43.8 \pm 3.1	9
UVA (300 kJ/m ²)	6.6 \pm 0.9	110.8 \pm 7.1	17
4-NQO (0.005 μ g/ml)	5.1 \pm 1.1	39.8 \pm 3.5	8
4-NQO (0.01 μ g/ml)	7.3 \pm 1.7	95.2 \pm 8.5	13
MMS (0.001%)	2.4 \pm 0.5	8.4 \pm 1.5	3
MMS (0.05%)	5.3 \pm 0.9	13.4 \pm 2.8	2
254-nm UV light (10 J/m ²)	4.1 \pm 0.7	7.9 \pm 1.6	2

parental and mutant strains were challenged, or not, with 0.5 μ g/ml of 4-NQO for 1 h, followed by isolation of chromosomal DNA and quantitation of strand breaks by alkaline sucrose density gradient analysis (21). Undamaged DNA isolated from either the parent or the mutant were indistinguishable with respect to size sedimentation (Fig. 4A). In response to 4-NQO treatment, however, chromosomal DNA from both strains were fragmented and in each case appeared to sustain the same extent of initial damage (Fig. 4B). When the cells were washed free of 4-NQO and allowed to recover for 8 h in fresh growth medium, the parental DNA was completely restored to high molecular weight status, whereas only approximately 40% of the EBY2-derived DNA was fully restored to its native size (Fig. 4C). Higher doses of 4-NQO (1.0 μ g/ml for 1 h) resulted in further accumulation of fragmented DNA only in the mutant, and at 2 μ g/ml of 4-NQO for 1 h, no restoration of high molecular weight DNA was observed in the mutant, whereas 55% of the parental DNA had recovered (data not shown). These data are consistent with the notion that 4-NQO induces two types of DNA lesion, only one of which is repaired less efficiently by the *ytpa1* mutant.

ytpa1 Null Mutants Exhibit a Hypermutable Phenotype—Because our data are consistent with the notion that yPtpa1p plays a role in the repair of 4-NQO-induced oxidative DNA lesions, this protein may be expected to act similarly for spontaneously occurring oxidative DNA lesions generated during aerobic growth. We therefore measured the reversion mutation rate at the *ade-2* locus in a wild type strain MKP-o, and in the isogenic *ytpa1* null mutant EBY3. The *ade-2* allele bears an ochre stop codon that results in a truncated protein unable to support adenine biosynthesis, *i.e.* the strain depends on exogenous adenine for growth. Under normal growth conditions, EBY3 showed a 3-fold increased rate of reversion to Ade⁺, as compared with MKP-o (Table I). This suggests that yPtpa1 may participate in the repair of endogenously generated DNA lesions. The reversion rate to Ade⁺ was increased by as much as 9-fold when the mutant was irradiated with 150 kJ/m² of UVA light and up to 17-fold with 300 kJ/m², whereas this rate was increased only approximately 2-fold in wild type cells irradiated with 300 kJ/m² UVA. Exposure to sublethal doses of 4-NQO, *i.e.* 0.005 and 0.01 μ g/ml, also dramatically increased the mutation rate in the *ytpa1* mutant by 8- and 13-fold, respectively, as compared with an increase of only 2-fold in parental cells treated with 0.01 μ g/ml of 4-NQO. There was no striking difference in the mutation rate between MKP-o and EBY3 upon exposure to MMS or 254-nm UV light, relative to untreated cells (Table I).

yPtpa1p Does Not Mediate Its Effect via the Pph21p or Pph22p Phosphatase—To explore the role of specific yeast protein phosphatases in the cellular response to 4-NQO-induced

DNA damage, we examined whether yeast mutants bearing mutations in two redundant PP2A phosphatase genes *PPH21* and *PPH22* (encoding proteins that display nearly 80% amino acid identity to the catalytic subunit of mammalian PP2A) are hypersensitive to 4-NQO (29, 30). Single mutants lacking either Pph21p or Pph22p protein phosphatase were not sensitive to 4-NQO (Fig. 5). The absence of drug sensitivity in either single mutant could be explained if there is functional redundancy between Pph21p and Pph22p. However, it is unlikely that one phosphatase substituted for the other, because a *pph21 pph22* double mutant was also found to be resistant to 4-NQO (Fig. 5). Furthermore, overproduction of either Pph21p or Pph22p conferred no 4-NQO or UVA resistance to the *ytpa1* mutant (Fig. 5). This finding suggests that yPtpa1p may not activate either Pph21p or Pph22p.

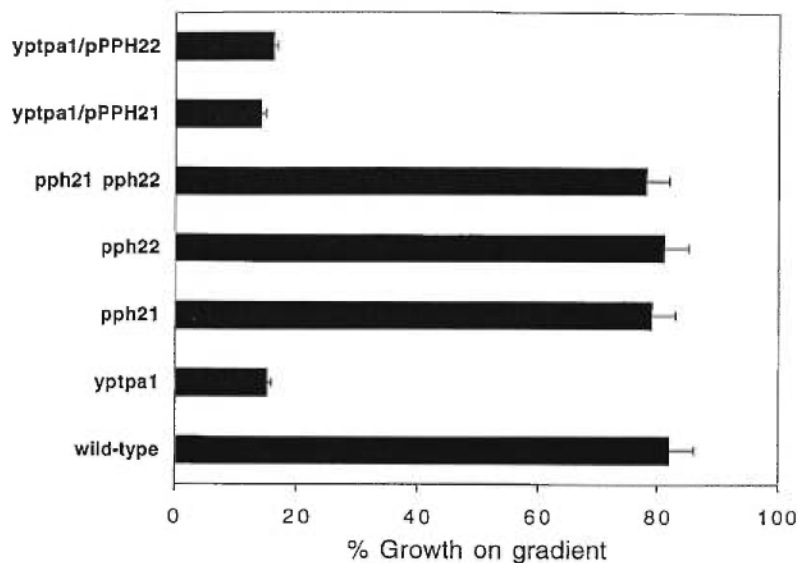
DISCUSSION

The results presented here provide novel evidence that the previously identified but functionally uncharacterized *S. cerevisiae* gene, herein designated *yPTPA1*, plays a significant role in cellular protection against the model DNA-damaging agent 4-NQO. Moreover, *ytpa1* null mutants exhibit prominent phenotypic characteristics that are consistent with a defect in the repair of 4-NQO-induced oxidative DNA lesions rather than of classical 4-NQO-induced bulky adducts, including (i) wild type resistance to 254-nm UV light, which shares considerable genotoxic properties with 4-NQO but does not significantly alter the redox state of the cell with respect to cytotoxicity and mutagenesis (31); (ii) cross-sensitivity to the cytotoxic and mutagenic effects of UVA, an agent that acts virtually exclusively through the generation of reactive oxygen species (32, 33); (iii) only marginal sensitivity to killing by UVB, which has an oxidative component but nonetheless closely resembles 254-nm UV light in genotoxic properties (34, 35); (iv) a spontaneous mutator phenotype, which is characteristic of prokaryotic and eukaryotic mutants deficient in the cellular response to oxidative DNA damage (36); and (v) impaired recovery of high molecular weight DNA following 4-NQO exposure, strongly indicating a defect at the level of DNA repair. We note that the *ytpa1* mutant is not sensitive to the powerful oxidant ionizing radiation, which acts principally through the formation of hydroxyl radicals, rather than via singlet oxygen that is implicated in the genotoxic effect of UVA (32, 33). The overall data strongly support the notion that 4-NQO-induced oxidative DNA damage, in addition to the well characterized N-2 and N-6 adducts of guanine and adenine, respectively, can exert considerable cytotoxic and premutagenic potential in eukaryotic cells.

The fact that *ytpa1* mutants are cross-sensitive to the cytotoxic and mutagenic effects 4-NQO and UVA presumably reflects the production of a common oxidative DNA lesion(s). This lesion would not appear to be 8-oxoguanine or AP sites, because unlike the case for *E. coli*, yeast mutants lacking either the enzyme Ogg1p (corresponding to the bacterial Fpg protein) or the major AP endonuclease Apn1, are not sensitive to either UVA or 4-NQO.² This difference between bacteria and yeast may be explained if the latter retains "backup" proteins to repair 4-NQO-induced oxidative DNA lesions. In support of this assumption, it has been shown that yeast expresses the protein Ogg2p, which displays similar activities to Ogg1, as well as another AP endonuclease, Pde1p (38, 39). In any case, the culpable premutagenic oxidative lesion(s) common to 4-NQO- and UVA-exposed cells and the yPtpa1p-mediated pathway that alleviates its (their) genotoxic potential remain to be characterized.

² D. Ramotar, unpublished data.

FIG. 5. Resistance of yeast strains to 4-NQO. Bars indicate wild type (W303a) and the following isogenic mutant strains: EBY4 (*ytpa1Δ::LEU2*), DEY142-4D (*pph21Δ1::HIS3*), DEY10-2C (*pph22Δ1::URA3*), DEY22-12 (*pph21Δ1::HIS3, pph22-12*), and EBY4 carrying the multicopy plasmid pPPH21 or pPPH22. For simplicity, mutants are indicated by their deleted genes. Growth all along the gradient is taken to be 100% (see "Materials and Methods"). The bottom layer of the gradient contained 15 μ g of 4-NQO.



We have noted, however, that yPtpa1p manifests significant homology with human hPTPA, which was shown to stimulate the weak phosphotyrosine phosphatase activity of PP2A in an ATP- and Mg^{2+} -dependent manner (26, 27). However, the biological consequences of this phosphatase activation step in human cells remain unclear. Based on our present findings that reveal a novel role for yPtpa1p in the repair of 4-NQO-induced oxidative DNA damage in yeast, we predict that hPTPA could perform a similar function in human cells. Indeed, considering the ubiquitous participation of reversible protein phosphorylation in diverse cellular processes (40, 41), including the overall response to genotoxic agents, e.g. cell cycle arrest (42) and apoptosis (43), it is reasonable to anticipate that protein phosphatases also play an essential role in DNA repair. Preliminary evidence for the involvement of cellular PP2A phosphatases in NER has been obtained in human cells *in vitro* (37). In this study, specific inhibitors of PP2A were shown to interfere with the NER activity of human HeLa cell extracts, an effect that could be fully reversed by the addition of purified PP2A protein (37). However, the exact component of the NER pathway that is dephosphorylated by PP2A to allow efficient repair *in vitro* is unknown, and certainly, any precise *in vivo* roles for specific protein phosphatases in the DNA repair process remain to be elucidated.

It will therefore be crucial to identify the cellular targets, presumably (but not necessarily) corresponding to a protein phosphatase(s), that interact with yPtpa1p to protect against the genotoxic effects of 4-NQO/UVA exposure. In *S. cerevisiae*, there are two distinct families of serine/threonine protein phosphatases, PPP and PP2C (30). The PPP family consists of at least 12 members, Glc7, Pph21, Pph22, Cna1, Cna2, Ppz1, Ppz2, Sal6, Pph3, Sit4, Ppg1, and Ppt1 (30), which are further subdivided on the basis of enzymatic properties into three classes, PP2A, PP2B, and PP1. The PP2A members, including Pph3, Pph21, Pph22, Sit4, and Ppg1, are trimeric holoenzymes consisting of a 35-kDa catalytic subunit, a 65-kDa constant regulatory subunit, and a variable regulatory subunit ranging from 54 to 74 kDa in size (30). The constant and variable regulatory subunits are important for controlling phosphatase activity, substrate specificity, and cellular localization.

In view of the aforementioned putative role of PP2A-type phosphatases in human NER and the fact that hPTPA is capable of activating these phosphatases *in vitro* (26–27), we hypothesized that certain PP2A-related enzymes in yeast

might play a role in the cellular response to 4-NQO. However, it is unlikely that yPtpa1p mediates its biological effect via Pph21 or Pph22, because mutants lacking these serine/threonine phosphatases did not manifest hypersensitivity to either UVA or 4-NQO. Furthermore, overproduction of these same phosphatases in the *ytpa1* mutant did not confer increased resistance to UVA or 4-NQO. Full characterization of additional 4-NQO/UVA-sensitive mutants, coupled with direct investigation of proteins that interact with yPtpa1p, may be expected to shed significant light on the precise protective pathway mediated by this protein in yeast.

REFERENCES

1. Sugimura, T., Okabe, K., and Nagao, M. (1966) *Cancer Res.* **26**, 1717–1721
2. Caliegue-Zouitina, S., Bailleul, B., Ginot, Y., Perly, B., Vigny, P., and Loucheux-Lefebvre, M.-H. (1986) *Cancer Res.* **46**, 1858–1863
3. Prakash, S., Sung, P., and Prakash, L. (1993) *Annu. Rev. Genet.* **27**, 33–70
4. Hoeljmackers, J. H. J. (1993) *Trends Genet.* **9**, 173–177
5. Van Houten, B. (1990) *Microbiol. Rev.* **54**, 18–51
6. Svoboda, D. L., Taylor, J.-S., Hearst, J. E., and Sancar, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1931–1936
7. Felkner, I. C., and Kadlubar, F. (1968) *J. Bacteriol.* **96**, 1448–1449
8. Nunoshiba, T., and Demple, B. (1993) *Cancer Res.* **53**, 3250–3252
9. Yamamoto, K., Inoue, S., and Kawanishi, S. (1993) *Carcinogenesis* **14**, 1397–1401
10. Kohda, K., Tada, M., Kasai, H., Nishimura, S., and Kawazoe, Y. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 626–632
11. Boiteux, S., O'Connor, T. R., Lederer, F., Gouyette, A., and Laval, J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3916–3922
12. Loeb, L. A., and Preston, B. D. (1986) *Annu. Rev. Genet.* **20**, 201–230
13. Ramotar, D. (1997) *Biochem. Cell Biol.* **75**, 327–336
14. Ruiz-Laguna, J., Ariza, R. R., Prieto-Alamo, M. J., Boiteux, S., and Pueyo, C. (1994) *Carcinogenesis* **15**, 425–429
15. Sherman, F., Fink, G., and Hicks, J. (1983) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
16. Guthrie, C., and Fink, G. R. (1991) *Methods Enzymol.* **194**
17. Gietz, R. D., and Schiestl, R. H. (1992) *Yeast* **7**, 253–263
18. Ramotar, D. (1995) *Mol. Cell. Biochem.* **145**, 185–187
19. Masson, J.-Y., and Ramotar, D. (1996) *Can. J. Microbiol.* **42**, 835–843
20. Ramotar, D., and Demple, B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 7368–7374
21. Masson, J.-Y., and Ramotar, D. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2091–2100
22. Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988) *Gene (Amst.)* **74**, 527–534
23. Schmitt, M. E., Brown, T. A., and Trumppower, B. L. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 3091–3092
24. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 543–5467
25. Paques, F., and Haber, J. E. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6765–6771
26. Cayla, X., Van Hoof, C., Bosch, M., Waelkens, E., Vandekerckhove, J., Peeters, B., Merlevede, W., and Goris, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15668–15675
27. Cayla, X., Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R., and Merlevede, W. (1990) *Biochemistry* **29**, 658–667
28. Saraste, M., Sibbald, P. R., and Wittinghofer, A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430–434
29. Sneddon, A. A., Cohen, P. T. W., and Stark, M. J. R. (1990) *EMBO J.* **9**, 4339–4346

30. Stark, M. J. R. (1996) *Yeast* **12**, 1647-1675
31. Tyrrell, R. M. (1996) *BioEssays* **18**, 139-148
32. Tyrrell, R. M., and Keyse, S. M. (1990) *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **4**, 349-361
33. Tyrrell, R. M., and Pidoux, M. (1989) *Photochem. Photobiol.* **49**, 407-412
34. Drobetsky, E. A., Turcotte, J., and Chateauneuf, A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2350-2354
35. Armstrong, J. D., and Kunz, B. A. (1992) *Mutat. Res.* **268**, 83-94
36. Kunz, B. A., Henson, E. S., Roche, H., Ramotar, D., Nunoshiba, T., and Demple, B. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8165-8169
37. Ariza, R. R., Keyse, S. M., Moggs, J. G., and Wood, R. D. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 433-440
38. Nash, H. M., Bruner, S. D., Scharer, O. D., Kawate, T., Addona, T. A., Spooner, E., Lane, W. S., and Verdine, G. L. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 968-980
39. Sander, M., and Ramotar, D. (1997) *Biochemistry* **36**, 6100-6106
40. Cohen, P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453-508
41. Munby, W., and Walter, G. (1993) *Physiol. Rev.* **73**, 673-699
42. Weinert, T. (1997) *Science* **277**, 1450-1451
43. Morana, S. J., Wolf, C. M., Li, J., Reynolds, J. E., Brown, M. K., Eastman, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18263-18271

VII. RÉFÉRENCES

Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protic, M., Hubscher, U., Egly, J. M., and Wood, R. D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 80, 859-868.

Ahrens, C., Grewe, M., Berneburg, M., Grether-Beck, S., Quilliet, X., Mezzina, M., Sarrasin, A., Lehmann, A. R., Arlett, C. F., and Krutmann, J. (1997). Photocarcinogenesis and inhibition of intercellular adhesion molecule 1 expression in cells of DNA-repair-defective individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 6837-6841.

Alessi, D. R., Smythe, C., and Keyse, S. M. (1993). The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene* 8, 2015-2020.

Ames, B. N. (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. *Free Radic. Res. Comms.* 7, 121-128.

Applegate, L. A., and Frenk, E. (1995). Cellular defence mechanisms of the skin against oxidant stress and in particular UVA radiation. *European Journal of Dermatology* 5, 97-103.

Araujo, S. J., and Wood, R. D. (1999). Protein complexes in nucleotide excision repair. *Mutat. Res. DNA Repair* 435, 23-33.

Ariza, R. R., Keyse, S. M., Moggs, J. G., and Wood, R. D. (1996). Reversible protein phosphorylation modulates nucleotide excision repair of damaged DNA by human cell extracts. *Nucleic Acids Research* 24, 433-440.

Arrigo, A.-P. (1995). Cell stress genes during development. *Neuropath. and Applied Neurobiol* 21, 488-491.

Asahina, H., Kuraoka, I., Shirakawa, M., Morita, E. H., Miura, N., Miyamoto, I., Ohtsuka, E., Okada, Y., and Tanaka, K. (1994). The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA damage. *Mutation Research* 315, 229-237.

Auffret van der Kemp, P., Thomas, D., Barbey, R., de Oliveira, R., and Boiteux, S. (1996). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 5197-5202.

Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., Van Dyck, L., and Goffreau, A. (1994). PRD5 a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *Journal of Biological Chemistry* *269*, 2206-2214.

Barak, Y., Cohen-Fix, O., and Livneh, Z. (1995). Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA. Significance for UV light mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* *270*, 24174-24179.

Barker, D., Dixon, K., Medrano, E. E., Smalara, D., Im, S., Mitchell, D., Babcock, G., and Abdel-Malek, Z. (1995). Comparison of the responses of human melanocytes with different melanin contents to ultraviolet B irradiation. *Cancer Research* *55*, 4041-4046.

Barzilay, G., and Hickson, I. D. (1995). Structure and function of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Bioessays* *17*, 713-719.

Basu, A. K., Loechler, E. L., Leadon, S. A., and Essigmann, J. M. (1989). Genetic effects of thymine glycols: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 7677-7681.

Basu-Modak, S., and Tyrrell, R. M. (1993). Singlet oxygen: a primary effector in the ultraviolet A/near-visible light induction of the human heme oxygenase gene. *Cancer Research* *53*, 4505-4510.

Beissinger, M., and Buchner, J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biol. Chem* *379*, 245-259.

Bélangier, E. (1997). Caractérisation du gène *yPTPA*, partageant une homologie avec le gène humain *PTPA*, impliqué dans la protection contre certains composés causant des dommages oxydatifs à l'ADN chez *Saccharomyces cerevisiae*. In Département de biologie cellulaire et moléculaire (Québec: Université Laval), pp. 82.

Berg, R. J. W., de Gruijl, F. R., and van der Leun, J. C. (1993). Interaction between ultraviolet A and ultraviolet B radiations in skin cancer induction in hairless mice. *Cancer Research* 53, 4212-4217.

Black, S., Andrews, P. D., Sneddon, A. A., and Stark, M. J. R. (1995). A regulated MET3-GLC7 gene fusion provides evidence of a mitotic role for *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 1. *Yeast* 11, 747-759.

Bohr, V. A., Dianov, G., Balajee, A., May, A., and Orren, D. K. (1998). DNA repair and transcription in human premature aging disorders. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceeding* 3, 11-13.

Boiteux, S. (1993). Properties and biological functions of the Nth and Fpg proteins of *Escherichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *Photochem. Photobiol. B.* 19, 87-96.

Bourre, F., Renault, G., and Sarasin, A. (1987). Sequence effect on alkali-sensitive sites in UV-irradiated SV40 DNA. *Nucleic Acids Research* 15, 8861-8875.

Boyd, N. F., and McGuire, V. (1991). The possible role of lipid peroxydation in breast cancer risk. *Free Radic. Biol. Med.* 10, 185-190.

Brash, D. E., and Haseltine, W. A. (1982). UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots. *Nature* 298, 189-192.

Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, G. J., Halperin, A. J., and Pontén, J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10124-10128.

Brash, D. E., Seetharam, S., Kraemer, D. H., Seidmann, M. M., and Bredberg, A. (1987). Photoproduct frequency is not the major determinant of UV base substitution hot spots or cold spots in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3782-3786.

Brennan, R. J., Swoboda, B. E., and Schiestl, R. H. (1994). Oxidative mutagens induce intrachromosomal recombination in yeast. *Mutation Research* 308, 159-167.

Brodsky, J. L., and Pipas, J. M. (1998). Polyomavirus T antigens: molecular chaperones for multiprotein complexes. *Journal of Virology* 72, 5329-5334.

Campbell, C., Quinn, A. G., Angus, B., Farr, P. M., and Rees, J. L. (1993). Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. *Cancer Research* 53, 2697-2699.

Cannon, J. F., Pringle, J. R., Fiechter, A., and Khalil, M. (1994). Characterisation of glycogen-deficient *GLC* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 136, 485-503.

Caplan, A. J., Tsai, J., Casey, P. J., and Douglas, M. G. (1992). Farnesylation of Ydj1p is required for function at elevated growth temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 267, 18890-18895.

Carrell, R. W., and Lomas, D. A. (1997). Conformational disease. *Lancet* 350, 134-138.

Carty, M. P., Lawrence, C. W., and Dixon, K. (1996). Complete replication of plasmid DNA containing a single UV-induced lesion in human cell extracts. *Journal of Biological Chemistry* 271, 9637-9647.

Cayla, X., Ballmer-Hofer, K., Merlevede, W., and Goris, J. (1993). Phosphatase 2A associated with polyomavirus small t or middle T antigen is an okadaic acid sensitive tyrosyl phosphatase. *Eur. J. Biochem.* 214, 281-286.

Cayla, X., Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R., and Merlevede, W. (1990). Isolation and characterization of a tyrosyl phosphatase activator from rabbit skeletal muscle and *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry* 29, 658-667.

Cayla, X., Van Hoof, C., Bosch, M., Waelkens, E., Vandekerckhove, J., Peeters, B., Merlevede, W., and Goris, J. (1994). Molecular cloning, expression, and characterization of PTPA, a protein that activates the tyrosyl phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 15668-15675.

Cerutti, P. A. (1994). Oxy-radicals and cancer. *Lancet* 344, 862-863.

Chan, G. L., Doetsch, P. W., and Haseltine, W. A. (1985). Cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts block polymerization by DNA polymerase I. *Biochemistry* 24, 5723-5728.

Cheetham, M. E., Brion, J.-P., and Anderton, B. H. (1992). Human homologues of the bacterial heat-shock protein DnaJ are preferentially expressed in neurons. *Biochem J.* 284, 469-476.

Chneiweiss, H. (1998). Protéine phosphatase: l'autre plateau de la balance. *Médecine/Sciences* 14, 259-261.

Ciarrocchi, G., and Pedrini, A. M. (1982). Determination of pyrimidine dimer unwinding angle by measurement of DNA electrophoretic mobility. *J. Mol. Biol.* 155, 177-183.

Clark, J. M., and Beardsley, G. P. (1989). Template length sequence context, and 3'-5' exonuclease activity modulate replicative bypass of thymine glycol lesions in vitro. *Biochemistry* 28, 774-779.

Coffer, P. J., Burgering, B. M., Peppelenbosch, M. P., Bos, J. L., and Kruijer, W. (1995). UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene* 11, 561-569.

Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453-508.

Cohen, P. T. W. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci.* 22, 245-251.

Connor, M. J., and Wheeler, L. A. (1987). Depletion of cutaneous glutathione by ultraviolet radiation. *Photochem. & Photobiol.* 46, 239-245.

Coogan, T. P., Motz, J., and Christie, N. T. (1992). Repair of X-ray induced DNA strand damage by isolated rat splenic lymphocytes. *Mutation Research* 293, 39-46.

Cooper, P. K., Nousek, T., Clarkson, S. G., and Leadon, S. A. (1997). Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science* 275, 990-993.

Cui, Z., Shiraki, T., Hirata, D., and Miyakawa, T. (1998). Yeast gene *YRRI*, which is required for resistance to 4-nitroquinoline *N*-oxide, mediates transcriptional activation of the multidrug resistance transporter gene *SNQ2*. *Molecular Microbiology* 29, 1307-1315.

Cunningham, R. P. (1996). DNA-repair: How yeast repairs radical damage. *Curr. Biol.* 6, 1230-1233.

Cunningham, R. P., Saporito, S. M., Spitzer, S. G., and Weiss, B. (1986). Endonuclease IV (nfo) mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 168, 1120-1127.

Cyr, D. M., and Douglas, M. G. (1994). Differential regulation of Hsp70 subfamilies by the eucaryotic DnaJ homologue *YDJI*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 9798-9804.

Cyr, D. M., Lu, X., and Douglas, M. G. (1992). Regulation of Hsp70 function by a eukaryotic DnaJ homolog. *Journal of Biological Chemistry* 267, 20927-20931.

Davis, A. R., Alevy, Y. G., Chellaiah, A., Quinn, M. T., and Mohanakumar, T. (1998). Characterization of HDJ-2, a human 40 kD heat shock protein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30, 1203-1221.

De Flora, S., Benniselli, C., Camoirano, A., Serra, D., and Hochstein, P. (1988). Influence of DT diaphorase on the mutagenicity of organic and inorganic compounds. *Carcinogenesis (Lond)* 9, 611-617.

de Gruijl, F. R. (1996). Photobiology of photocarcinogenesis. *Photochem. & Photobiol.* 63, 372-375.

de Gruijl, F. R., Sterenborg, H. J. C. M., Forbes, P. H., Davies, R. E., Cole, C., Kelkens, G., van Weelden, H., Slaper, H., and van der Leun, J. C. (1993). Wavelength dependence of skin cancer induction by ultraviolet irradiation of albino hairless mice. *Cancer Research* 53, 53-60.

DeMott, M. S., Shen, B., Park, M. S., Bambara, R. A., and Zigman, S. (1996). Human *RAD2* homolog 1 5'- to 3'-exo/endonuclease can efficiently excise a displaced DNA fragment containing a 5'-terminal abasic lesion by endonuclease activity. *Journal of Biological Chemistry* 271, 30068-30076.

- Demple, B. (1991). Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu. Rev. Genet.* 25, 315-337.
- Demple, B., and Amabile-Cuevas, C. F. (1991). The control of oxydative stress responses. *Cell* 67, 837-839.
- Demple, B., and Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63, 915-948.
- Demple, B., and Linn, S. (1982). 5,6-Saturated thymine lesions in DNA: production by ultraviolet light or hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Research* 10, 3781-3789.
- Desai, C. J., Gindhart, J. G., Goldstein, L. S., and Zinn, K. (1996). Receptor tyrosine phosphatases are required for motor axon guidance in the drosophila embryo. *Cell* 84, 599-609.
- Devary, Y., Gottlieb, R., Smeal, T., and Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* 71, 1081-1091.
- Devasagayam, T. P., Steenken, S., Obendorf, M. S., Schulz, W. A., and Sies, H. (1991). Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* 30, 6283-6289.
- Dianov, G., and Lindahl, T. (1994). Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. *Curr. Biol.* 4, 1069-1076.
- Diaz, J.-J., Rhoads, D. D., and Roufa, D. J. (1991). PCR-mediated chemical mutagenesis of cloned duplex DNAs. *BioTechniques* 11, 204-211.
- Donahue, B. A., S., Y., Taylor, J.-S., Reines, D., and Hanawalt, P. C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8502-8506.
- Donawho, C., Wolf, P., and Kripke, M. (1994). Enhanced development of murine melanoma in UV-irradiated skin: UV dose response, waveband dependence, and relation to inflammation. *Melanoma Re.* 4, 93-100.

Drobetsky, E. A., Grosovsky, A. J., and Glickman, B. W. (1987). The specificity of UV-induced mutations at an endogenous locus in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *84*, 9103-9107.

Drobetsky, E. A., Moustacchi, E., Glickman, B. W., and Sage, E. (1994). The mutational specificity of simulated sunlight at the *aprt* locus in rodent cells. *Carcinogenesis* *15*, 1577-1583.

Drobetsky, E. A., and Sage, E. (1993). UV-induced G:C-->A:T transitions at the APRT locus of Chinese hamster ovary cells cluster at frequently damaged 5'-TCC-3' sequences. *Mutation Research* *289*, 131-138.

Drobetsky, E. A., Turcotte, J., and Chateauneuf, A. (1995). A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 2350-2354.

Drouin, R., and Therrien, J. P. (1997). UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimer frequency correlates with skin cancer mutational hotspots in p53. *Photochem. & Photobiol.* *66*, 719-726.

Dudek, E. J., Peak, J. G., Roth, R. M., and Peak, M. J. (1993). Isolation of V79 fibroblast cell lines containing elevated metallothionein levels that have increased resistance to the cytotoxic effects of ultraviolet-A radiation. *Photochem. & Photobiol.* *58*, 836-840.

Dynan, W. S. (1986). Promoters for housekeeping genes. *Trends Genet.* *2*, 196-197.

Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K., and Karin, M. (1994). The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell* *77*, 381-390.

Englaro, W., Dérijard, B., Ortonne, J.-P., and Ballotti, R. (1998). Solar ultraviolet light activates extracellular signal-regulated kinases and the ternary complex factor in human normal keratinocytes. *Oncogene* *16*, 661-664.

Evangelista, C. C., Torres, A. M. R., Limbach, M. P., and Zitomer, R. S. (1996). *ROX3* and *RTS1* function in the global stress response pathway in baker's yeast. *Genetics* *142*, 1083-1093.

Evans, E., Fellows, J., Coffey, A., and Wood, R. D. (1997). Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *EMBO J.* *16*, 625-638.

Evans, J., Maccabee, M., Hatahet, Z., Courcelle, J., Bockrath, R., Ide, H., and Wallace, S. (1993). Thymine ring saturation and fragmentation products: lesion bypass, misinsertion and implications for mutagenesis. *Mutation Research* *299*, 147-156.

Felkner, I. C., and Kadlubar, F. (1968). Parallel between ultraviolet light and 4-nitroquinoline-1-oxide sensitivity in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *96*, 1448-1449.

Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C., and Struhl, K. (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Molecular and Cellular Biology* *17*, 6982-6993.

Fiscella, M., Zhang, H., Fan, S., Sakaguchi, K., Shen, S., Mereer, W. E., Vande Woode, G. F., O'Connor, P. M., and Appella, E. (1997). Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 6048-6053.

Fisher, G. J., and Johns, H. E. (1976). *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, Volume I (New York: Academic Press Inc.).

Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkinas, O. M., Laval, J., and Dogliotti, E. (1999). The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 15230-15236.

Fox, M. E., Feldman, B. J., and Chu, G. (1994). A novel role for DNA photolyase: binding to DNA damaged by drugs is associated with enhanced cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* *14*, 8071-8077.

Frederick, J. E., and Alberts, A. D. (1992). *Biological Responses to ultraviolet A radiation*, F. Urbach, ed. (Overland Park, KS: Vandenmar).

Friedberg, E. C. (1985). Nucleotide excision repair of DNA in eukaryotes: comparisons between human cells and yeast. *Cancer Surveys* *4*, 529-555.

Friedberg, E. C., Walker, G. C., and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis (Washington D.C.: ASM press).

Fritzell, J. A., Narayanan, L., Baker, S. M., Bronner, C. E., Andrew, S. E., Prolla, T. A., Bradley, A., Jirik, F. R., Liskay, R. M., and Glazer, P. M. (1997). Role of DNA mismatch repair in the cytotoxicity of ionizing radiation. *Cancer Research* 57, 5143-5147.

Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L. S., Lane, D. P., Abbondandolo, A., and Dogliotti, E. (1996). Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 271, 9573-9578.

Frydman, J., and Höhfeld, J. (1997). Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *TIBS* 22, 87-92.

Gaboriau, F., Morlière, P., Marquis, I., Moysan, A., Gèze, M., and Dubertret, L. (1993). Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation. *Photochem. & Photobiol.* 58, 515-520.

Gale, J. M., Nissen, K. A., and Smerdon, M. J. (1987). UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6644-6648.

Gale, J. M., and Smerdon, M. J. (1988). Photofingerprint of nucleosome core DNA in intact chromatin having different structural states. *J. Mol. Biol.* 204, 949-958.

Gale, J. M., and Smerdon, M. J. (1990). UV induced (6-4) photoproducts are distributed differently than cyclobutane dimers in nucleosomes. *Photochem. & Photobiol.* 51, 411-417.

Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B., Ginot, Y., Perly, B., Vigny, P., and Loucheux-Lefebvre, M.-H. (1986). N²-guanyl and N⁶-adenyl arylation of chicken erythrocyte DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Research* 46, 1858-1863.

Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B., and Loucheux-Lefebvre, M.-H. (1985). Adducts from *in vivo* action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rats and from *in vitro* reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides. *Cancer Research* 45, 520-525.

Game, J. C., and Kaufman, P. D. (1999). Role of *Saccharomyces cerevisiae* chromatin assembly factor-I in repair of ultraviolet radiation damage *in vivo*. *Genetics* 151, 485-497.

Gary, R., Kim, K., Cornelius, H. L., Park, M. S., and Matsumoto, Y. (1999). Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *Journal of Biological Chemistry* 274, 4354-4363.

Gasparro, F. P., and Fresco, J. R. (1986). Ultraviolet-induced 8,8-adenine dehydrodimers in oligo- and polynucleotides. *Nucleic Acids Research* 14, 4239-4251.

Georgopoulos, C. P. (1977). A new bacterial gene (groPC) which affects lambda DNA replication. *Mol. Gen. Genet.* 151, 35-39.

Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988). New yeast - *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base-pair restriction sites. *Gene* 74, 527-534.

Gilchrest, B. A., and Eller, M. S. (1999). DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 4, 35-40.

Girard, P. M., and Boiteux, S. (1997). Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie* 79, 559-566.

Glickman, B. W., Schaaper, R. M., Haseltine, W. A., Dunn, R. L., and Brash, D. E. (1986). The C-C (6-4) UV photoproduct is mutagenic in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6945-6949.

Godar, D. E., and Lucas, A. D. (1995). Spectral dependence of UV-induced immediate and delayed apoptosis: the role of membrane and DNA damage. *Photochem. & Photobiol.* 62, 108-113.

Gordon, L. K., and Haseltine, W. A. (1982). Quantitation of cyclobutane pyrimidine dimer formation in double- and single-stranded DNA fragments of defined sequence. *Radiation Research* 89, 99-112.

Grant, C. M., Collinson, L. P., Roe, J. H., and Dawaes, I. W. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* 21, 171-179.

Grether-Beck, S., Olaizola-Horn, S., Schmitt, H., Grewe, M., Jahnke, A., Johnson, J. P., Briviba, K., Sies, H., and Krutmann, J. (1996). Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 14586-14591.

Grosovsky, A. J., Drobetsky, E. A., deJong, P. J., and Glickman, B. W. (1986). Southern analysis of genomic alterations in gamma-ray-induced *aprt*- hamster cell mutants. *Genetics* 113, 405-415.

Guan, K., Hakes, D. J., Wang, Y., Park, H.-D., Cooper, T. G., and Dixon, J. E. (1992). A yeast protein phosphatase related to the vaccinia virus VH1 phosphatase is induced by nitrogen starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 12175-12179.

Hallstrom, T. C., Katzmann, D. J., Torres, R. J., Sharp, W. J., and Moye-Rowley, W. S. (1998). Regulation of transcription factor Pdr1p function by an Hsp70 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 18, 1147-1155.

Hamilton, K. K., Kim, P. M., and Doetsch, P. W. (1992). A eukaryotic DNA glycosylase/lyase recognizing ultraviolet light-induced pyrimidine dimers. *Nature* 356, 725-728.

Han, P., Clingen, P. H., Lowe, J. E., Katsuya, A., Arlett, C. F., and Green, M. H. (1998). Repair of cyclobutane pyrimidine dimers in unstimulated human mononuclear cells is deficient at very low fluences of ultraviolet B and is not enhanced by addition of deoxyribonucleosides. *Mutagenesis* 13, 353-356.

Hanawalt, P., and Mellon, I. (1993). Stranded in an active gene. *Curr. Biol.* 3, 67-69.

Hanawalt, P. C. (1994). Transcription-coupled repair and human disease. *Science* 266, 1957-1958.

Hanson, D. L., and DeLeo, V. A. (1989). Long wave ultraviolet radiation stimulates arachidonic acid release and cyclooxygenase activity in mammalian cells in culture. *Photochem. & Photobiol.* 49.

Harrington, J. J., and Lieber, M. R. (1994). Functional domains within FEN-1 and RAD2 define a family of structure-specific endonucleases: implications for nucleotide excision repair. *Genes & Development* 8, 1344-1355.

Harshman, K. D., Moye-Rowley, W. S., and Parker, C. S. (1988). Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from *GCN4*. *Cell* 53, 321-330.

Hattori-Nakakuki, Y., Nishgori, C., Okamoto, K., Imamura, S., Hiai, H., and Toyokuni, S. (1994). Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in epidermis of hairless mice exposed to near-UV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 1132-1139.

Hauser, J., Seidman, M. M., Sidur, K., and Dixon, K. (1986). Sequence specificity of point mutations induced during passage of a UV-irradiated shuttle vector plasmid in monkey cells. *Molecular and Cellular Biology* 6, 277-285.

Hayes, F. N., Williams, D. L., Ratliff, R. L., Varghese, A. J., and Rupert, C. S. (1971). Effect of a single thymine photodimer on the oligodeoxythymidylate-polydeoxyadenylate interaction. *Journal of the American Chemical Society* 93, 4940-4942.

Hayes, R. C., and LeClerc, J. E. (1986). Sequence dependence for bypass of thymine glycols in DNA by DNA polymerase I. *Nucleic Acids Research* 14, 1045-1061.

Hazrat, K., Izumi, T., Maid, T., Floyd, R. A., and Mitra, S. (1998). The presence of 2 distinct 8-oxoguanine repair enzyme in human cells: their complementary role in preventing mutation. *Nucleic Acids Research* 22, 5116-5122.

Hertle, K., Haase, E., and Brendel, M. (1991). The *SNQ3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals. *Current Genetics* 19, 429-433.

Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J., and Tsagoloff, A. (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2, 163-167.

Hinnebusch, A. G. (1984). Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6442-6446.

Horsfall, M. J., Borden, A., and Lawrence, C. W. (1997). Mutagenic properties of the T-C cyclobutane dimer. *J. Bacteriol.* 179, 2835-2839.

Hu, M. L., and Tappel, A. L. (1992). Potentiation of oxidative damage to proteins by ultraviolet-A and protection by antioxidants. *Photochem. & Photobiol.* 56, 357-363.

Huang, J., Hsu, D. S., Kazantsev, A., and Sancar, A. (1994). Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 12213-12217.

Huang, J. C., Svoboda, D. L., J.T., R., and Sancar, A. (1992). Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3664-3668.

Huot, J., Roy, G., Lambert, H., Chretien, P., and Landry, J. (1991). Increased survival after treatment with anti-cancer agents of Chinese hamster cells expressing the human 27 000 heat shock protein. *Cancer Research* 51, 5245-5252.

Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C., and Chu, G. (1999). Expression of the p48 *xeroderma pigmentosum* gene is p53 dependent and is involved in global genome repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 424-428.

Ikenaga, M., Ishii, Y., Tada, M., Kakunaga, T., Takebe, H., and Kondo, S. (1975). The major cause of inactivation and mutation by 4-nitroquinoline-1-oxide damage responsible for killing, mutation, and cancer. *J. Mol. Biol.* 92, 341-356.

Ikenaga, M., Takebe, H., and Ishii, Y. (1977). Excision repair of DNA base damage in human cells treated with the chemical carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Mutation Research* 43, 415-427.

Im, S., Moro, O., Peng, F., Medrano, E. E., Cornelius, J., Babcock, G., Nordlund, J. J., and Abdel-Malek, Z. A. (1998). Activation of the cyclic AMP pathway by α -melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Research* 58, 47-54.

Inga, A., Scott, G., Monti, P., Aprile, A., Abbondandolo, A., Burns, P. A., and Fronza, G. (1998). Ultraviolet-light induced p53 mutational spectrum in yeast is indistinguishable from p53 mutations in human skin cancer. *Carcinogenesis* 19, 741-746.

Ishikawa, T. (1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* 17, 463-468.

Ishizawa, M., and Endo, H. (1971). Mutagenesis of bacteriophage T 4 by a carcinogen, 4 - nitroquinoline I- oxide. *Mutation Research* 12, 1-8.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.

James, P., Halladay, J., and Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.

Jelinsky, S. A., and Samson, L. D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1486-1491.

Jenner, P. (1994). Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* 344, 796-798.

Jessus, C., Goris, J., Staquet, S., Cayla, X., Ozon, R., and Merlevede, W. (1989). Identification of the ATP + Mg-dependent and polycation-stimulated protein phosphatases in the germinal vesicle of the *Xenopus* oocyte. *Biochem. J.* 260, 45-51.

Johnson, A. W., and Demple, B. (1988b). Yeast DNA diesterase for 3'-fragments of deoxyribose: purification and physical properties of a repair enzyme for oxidative DNA damage. *Journal of Biological Chemistry* 263, 18009-18016.

Johnson, R. E., Kovvali, G. K., Prakash, L., and Prakash, S. (1995). Requirement of the yeast *RTH1* 5' to 3' exonuclease for the stability of simple repetitive DNA. *Science* 269, 238-240.

Johnson, R. E., Torres-Ramos, C. A., Izumi, T., Mitra, S., Prakash, S., and Prakash, L. (1998). Identification of *APN2*, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the major human AP endonuclease *HAPI*, and its role in the repair of abasic sites. *Genes and Development* 12, 3137-3143.

Jones, C. J., and Wood, R. D. (1993). Preferential binding of the *xeroderma pigmentosum* group A complementing protein to damaged DNA. *Biochemistry* 32, 12096-12104.

Jones, P. A., Rideout, W. M. d., Shen, J. C., Spruck, C. H., and Tsai, Y. C. (1992). Methylation, mutation and cancer. *Bioessays* 14, 33-36.

Kamiya, H., Iwai, S., and Kasai, H. (1998). The (6-4) photoproduct of thymine-thymine induces targeted substitution mutations in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 26, 2611-2617.

Kanaar, R., Hoeijmakers, J. H. J., and van Gent, D. C. (1998). Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends in Cell Biology* 8, 483-489.

Kataoka, N., Shibata, S., Imamura, A., Kawazoe, Y., Chihara, G., and Nagata, C. (1967). The structure of the free radical produced from carcinogenic 4- hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Chem. Phar. Bull.* 15, 220-225.

Kaufman, P. D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1997). Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes & Development* 11, 345-357.

Kaufmann, W. K., and Wilson, S. J. (1994). G1 arrest and cell-cycle-dependent clastogenesis in UV-irradiated human fibroblasts. *Mutation Research* 314, 67-76.

Keyse, S. M., and Emslie, E. A. (1992). Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* 359, 644-647.

Keyse, S. M., and Tyrrell, R. M. (1987). Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 262, 14821-14825.

Kim, J., and Linn, S. (1988). The mechanisms of action of *E. coli* endonuclease III and T4 UV endonuclease (endonuclease V) at AP sites. *Nucleic Acids Research* 16, 1135-1141.

Kim, J.-K., and Choi, B. (1995). The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4)photoproduct of thymidyl(3'5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement. *Eur. J. Biochem.* 228, 849-854.

Klotz, L. O., Briviba, K., and Sies, H. (1997). Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.* 408, 289-291.

Klungland, A., and Lindahl, T. (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (*FEN1*). *EMBO J.* 16, 3341-3348.

Kohda, K., Tada, M., Kasai, H., Nishimura, S., and Kawazoe, Y. (1986). Formation of 8-hydroxyguanine residues in cellular DNA exposed to the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 139, 626-632.

Kuge, S., and Jones, N. (1994). *YAP1* dependant activation of *TRX1* is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* 13, 655-664.

Kuge, S., Jones, N., and Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* 16, 1710-1720.

Kunz, B. A., and Armstrong, J. D. (1998). Differences in the mutational specificities of sunlight and UVB radiation suggest a role for transversion-inducing DNA damage in solar photocarcinogenesis. *Mutational Research* 422, 77-83.

Kupper, T. S., Chua, A. O., Flood, P., McGuire, J., and Gubler, U. (1987). Interleukine 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet radiation. *J. Clin. Invest.* 80, 430-436.

- Laspia, M. F., and Wallace, S. S. (1988). Excision repair of thymine glycols, urea residues, and apurinic sites in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *170*, 3359-3366.
- Leadon, S. A., Barbee, S. L., and Dun, A. B. (1995). The yeast *RAD2*, but not *RAD1* gene is involved in the transcription-coupled repair of thymine-glycols. *Mutation Research* *337*, 169-178.
- Leadon, S. A., and Cooper, P. K. (1993). Preferential repair of ionizing radiation-induced damage in the transcribed strand of an active human gene is defective in Cockayne syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 10499-10503.
- Lee, D. H., Sherman, M. Y., and Goldberg, A. L. (1996). Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* *16*, 4773-4781.
- Lehmann, A. R., and Carr, A. M. (1995). The *ataxia-telangiectasia* gene: a link between checkpoint controls, neurodegeneration and cancer. *Trends Genet* *11*, 375-377.
- Leonardo, A., Linke, S., Clarkin, K., and Wahl, G. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53 dependent G1 arrest and a long-term induction of CIP1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development.* *8*, 2540-2551.
- Lesko, S. A., Lorentzen, R. J., and Ts'o, P. O. P. (1980). Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission. *Biochemistry* *19*, 3023-3028.
- Levin, J. D., Johnson, A. W., and Demple, B. (1988). Homogeneous *Escherichia coli* endonuclease IV. *Journal of Biological Chemistry* *263*, 8066-8071.
- Lieber, M. (1997). The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. *BioEssays* *19*, 233-240.
- Lin, R. C., and Arndt, K. T. (1995). The role of *Saccharomyces cerevisiae* type 2A phosphatase in the actin cytoskeleton and in entry into mitosis. *EMBO J.* *14*, 2745-2759.
- Lindquist, S., and Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* *22*, 631-677.

- Lippke, J. A., Gordon, L. K., Brash, D. E., and Haseltine, W. A. (1981). Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *78*, 3388-3392.
- Liu, M., Dhanwada, K. R., Birt, D. F., Hecht, S., and Pelling, J. C. (1994). Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis* *15*, 1089-1092.
- Lloyd, R. S. (1998). Base excision repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutation Research* *408*, 159-170.
- Lloyd, R. S., Hanawalt, P. C., and Dodson, M. L. (1980). Processive action of T4 endonuclease V on ultraviolet-irradiated DNA. *Nucleic Acids Research* *8*, 5113-5127.
- Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A. J., and Drobetsky, E. A. (1997). A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Research* *57*, 3390-3394.
- Luke, M. M., Seta, F. D., Di Como, C. J., Sugimoto, H., Kobayashi, R., and Arndt, K. T. (1996). The SAPs, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Molecular and Cellular Biology* *16*, 2744-2755.
- Luke, M. M., Sutton, A., and Arndt, K. A. (1991). Characterization of *SISI*, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of bacterial DnaJ proteins. *J. Cell Biol.* *114*, 623-638.
- Lyamichev, V., Brow, M. A., and Dahlberg, J. E. (1993). Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* *260*, 778-783.
- Marchler, G., Shuller, C., Adam, G., and Ruis, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* *12*, 1997-2003.

Masson, J.-Y., and Ramotar, D. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* *IMP2* gene encodes a transcriptional activator that mediates protection against DNA damage caused by bleomycin and other oxidants. *Molecular and Cellular Biology* 16, 2091-2100.

Masson, J.-Y. (1997). Réparation de l'ADN apurinique/apyrimidinique ou endommagé par la bléomycine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse. Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université Laval. Québec.

Masson, J.-Y., and Ramotar, D. (1998). The transcriptional activator Imp2p maintains ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 149, 893-901.

Matsui, M. S., and DeLeo, V. A. (1990). Induction of protein kinase C activity by ultraviolet radiation. *Carcinogenesis* 11, 229-234.

Matsui, M. S., Wang, N., MacFarlane, D., and DeLeo, V. A. (1994). Long-wave ultraviolet radiation induces protein kinase C in normal human keratinocytes. *Photochem. & Photobiol.* 59, 53-57.

Matsumoto, Y., and Kim, K. (1995). Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* 269, 699-702.

Matsumoto, Y., Kim, K., and Bogenhagen, D. F. (1994). Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Molecular and Cellular Biology* 14, 6187-6197.

Matsunaga, T., Hieda, K., and Nikaido, O. (1991). Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6-4) photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm. *Photochem. & Photobiol.* 54, 403-410.

Matsunaga, T., Mu, D., Park, C.-H., Reardon, J. T., and Sancar, A. (1995). Human DNA repair excision nuclease. Analysis of the roles of the subunits involved in dual incisions by using anti-XPG and anti-ERCC1 antibodies. *Journal of Biological Chemistry* 270, 20862-20869.

Matsushima, T., Kobuna, I., and Sugimura, T. (1967). *In vivo* interaction of 4-nitroquinoline-1-oxide and its derivatives with DNA. *Nature* 216, 508.

Mayer, M. P., and Bukau, B. (1998). Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol. Chem.* *379*, 261-628.

Mazumder, A., Gerlt, J. A., Absalon, M. J., Stubbe, J., Cunningham, R. P., Withka, J., and Bolton, P. H. (1991). Stereochemical studies of the b-elimination reactions at aldehyde abasic sites in DNA: Endonuclease III from *Escherichia coli*, sodium hydroxide, and Lys-Trp-Lys. *Biochemistry* *30*, 1119-1126.

McCarty, J. S., Buchberger, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* *249*, 126-137.

Meister, A., and Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* *52*, 711-760.

Mellon, I., and Hanawalt, P. C. (1989). Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* *342*, 95-98.

Mellon, I., Spivak, G., and Hanawalt, P. C. (1987). Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian *DHFR* gene. *Cell* *51*, 241-249.

Michaels, M. L., Tchou, J., Grollman, A. P., and Miller, J. H. (1992). A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry* *31*, 10964-10968.

Mieczkowski, P. A., Fikus, M. U., and Ciesla, Z. (1997). Characterization of a novel DNA damage-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, DIN7, which is a structural homolog of the Rad2 and Rad27 DNA repair genes. *Mol. Gene. Genet.* *253*, 655-665.

Miller, J. A. (1970). Carcinogenesis by chemicals: an overview--G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer Research* *30*, 559-576.

Mirzayans, R., Sabour, M., Rauth, A. M., and Paterson, M. C. (1993). Hyperresistance to 4-nitroquinoline 1-oxide cytotoxicity and reduced DNA damage formation in dermal fibroblast strains derived from five members of a cancer-prone family. *Br. J. Cancer* *68*, 838-844.

Mitchell, D., L., Nguyen, T. D., and Cleaver, J. E. (1990). Nonrandom induction of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts in ultraviolet-irradiated human chromatin. *Journal of Biological Chemistry* *265*, 5353-5356.

Mitchell, D. L., Jen, J., and Cleaver, J. E. (1992). Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Research* *20*, 225-229.

Mitchell, D. L., and Nairn, R. S. (1989). The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem. & Photobiol.* *49*, 805-819.

Moggs, J. G., Yarema, K. J., Essigmann, J. M., and Wood, R. D. (1996). Analysis of incision sites produced by human cells extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-Cisplatin adduct. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 7177-7186.

Moller, P., Wallin, H., and Knudsen, L. E. (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem.-Biol. Interact* *102*, 17-36.

Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P., and Mager, W. (1996). The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* *19*, 651-658.

Morel, Y., and Barouki, R. (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Médecine/Sciences* *14*, 713-721.

Mori, T., Matsunaga, T., Hirose, T., and Nikaido, O. (1988). Establishment of a monoclonal antibody recognizing ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Mutation Research* *194*, 263-270.

Moshinsky, D. J., and Wogan, G. N. (1997). UV-induced mutagenesis of human p53 in a vector replicated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 2266-2271.

Moysan, A., Marquis, I., Gaboriau, F., Santus, R., Dubertret, L., and Morlière, P. (1993). Ultraviolet A-induced lipid peroxidation and antioxidant defense system in cultured human skin fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* *100*, 692-698.

Mu, D., Hsu, D. S., and Sancar, A. (1996). Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 8285-8294.

Mullenders, L. H. F., van Hoffen, A., Vreeswijk, M. P. G., Ruven, H.-J., Vrieling, H., and van Zeeland, A. A. (1997). Ultraviolet-induced photolesions: repair and mutagenesis. *Recent Results in Cancer Research* 143, 89-99.

Mumby, M. C., and Walter, G. (1993). Protein serine/threonine phosphatases , structure, regulation, and functions in cell. *Physiological Reviews* 73, 673-699.

Nakahara, W., Fukuoka, F., and Sugimura, T. (1957). Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide. *GANN* 48, 129-137.

Nash, H. M., Bruner, S. D., Scharer, O. D., Kawate, T., Addona, T. A., Spooner, E., Lane, W. S., and Verdine, G. L. (1996). Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* 6, 968-980.

Nealon, K., Nicholl, I. D., and M.K, K. (1996). Characterization of the DNA polymerase requirement of human base excision repair. *Nucleic Acids Research* 24, 3763-3770.

Nelson, B. H., McIntosh, B. C., Rosencrans, L. L., and Greenberg, P. D. (1997). Requirement for an initial signal from the membrane-proximal region of the interleudin 2 receptor γ chain for Janus kinase activation leading to T cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1878-1883.

Nunoshiba, T., and Demple, B. (1993). Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4- nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Research* 53, 3250-3252.

O'Day, C. L., Burgers, P. M., and Taylor, J. S. (1992). PCNA-induced DNA synthesis past cis-syn and trans-syn-I thymine dimers by calf thymus DNA polymerase delta *in vitro*. *Nucleic Acids Research* 20, 5403-5406.

O'Donovan, A., Davies, A. A., Moggs, J. G., West, S. C., and Wood, R. D. (1994). XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature* 351, 432-435.

- Oka, M., Nakai, M., Endo, T., Lim, C. R., Kimata, Y., and Kohno, K. (1998). Loss of hsp70-hsp40 chaperone activity causes abnormal nuclear distribution and aberrant microtubule formation in M-phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 29727-29737.
- Okumura, M., and Thomas, M. L. (1997). Regulation of immune function by protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Immun.* 7, 312-319.
- Olinski, R., Nackerdien, Z., and Dizdaroglu, M. (1992). DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in chromatin of gamma-irradiated or H₂O₂-treated cultured human cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 297, 139-143.
- Olive, P. L. (1998). The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiation Research* 150, S42-51.
- Olivero, S., Bléry, M., and Vivier, E. (1998). Régulation de l'activation cellulaire par les phosphatases. *Médecine/Sciences* 14, 262-268.
- Orna, M. V., and Mason, R. P. (1989). Correlation of kinetic parameters of nitroreductase enzymes with redox properties of nitroaromatic compounds. *Journal of Biological Chemistry* 264, 12379-12384.
- Palmer, C. M., Serafini, D. M., and Schellhorn, H. E. (1997). Near ultraviolet radiation (UVA and UVB) causes a formamidopyrimidine glycosylase-dependent increase in G to T transversions. *Photochem. & Photobiol.* 65, 543-549.
- Pan, Z. Q., Park, C. H., Amin, A. A., Hurwitz, J., and Sancar, A. (1995). Phosphorylated and unphosphorylated forms of human single-stranded DNA-binding protein are equally active in simian virus 40 DNA replication and in nucleotide excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4636-4640.
- Paques, F., and Haber, J. E. (1997). Two pathways for removal of nonhomologous DNA ends during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6765-6771.

Peak, J. G., and Peak, M. J. (1991). Comparison of initial yields of DNA-to-protein crosslinks and single-strand breaks induced in cultured human cells by far- and near-ultraviolet light, blue light and X-rays. *Mutation Research* 246, 187-191.

Peak, M. J., and Peak, J. G. (1982). Single-strand breaks induced in *Bacillus subtilis* DNA by ultraviolet light: action spectrum and properties. *Photochem. & Photobiol.* 35, 675-680.

Pehrson, J. R. (1989). Thymine dimer formation as a probe of the path of DNA in and between nucleosomes in intact chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9149-9153.

Peles, E., Nativ, M., Campbell, P. L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D. O., Schilling, J., Barnea, G., and Plowman, D. (1995). The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase β is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell* 82, 251-260.

Peng, W., and Shaw, B. R. (1996). Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers leads to CC-> TT transitions. *Biochemistry* 35, 10172-10181.

Pfeifer, G. P. (1997). Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochemis. & Photobiol.* 65, 270-283.

Pfeifer, G. P., Drouin, R., Riggs, A. D., and Holmquist, G. P. (1991). *In vivo* mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1374-1378.

Pflaum, M., Boiteux, S., and Epe, B. (1994). Visible light generates oxidative DNA base modifications in high excess of strand breaks in mammalian cells. *Carcinogenesis* 15, 297-300.

Piersen, C. E., Prince, M. A., Augustine, M. L., Dodson, M. L., and Lloyd, R. S. (1995). Purification and cloning of *Micrococcus luteus* ultraviolet endonuclease, an N-glycosylase/abasic lyase that proceeds via an imino enzyme-DNA intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 270, 23475-23484.

Porschke, D. (1973). A specific photoreaction in polydeoxyadenylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 2683-2686.

Posas, F., Clotet, J., and Arino, J. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* gene *SIT4* is involved in the control of glycogen metabolism. *FEBS* 279, 341-345.

Pourzand, C., Watkin, R. D., Brown, J. E., and Tyrrell, R. M. (1999). Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: the role of ferritin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6751-6756.

Prakash, L., Stewart, J. W., and Sherman, F. (1974). Specific induction of transitions and tranversions of GC base pairs by 4-nitroquinoline 1-oxide in iso-1-cytochrome c mutants of yeast. *J. Mol. Biol.* 85, 51-65.

Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233.

Pratt, W. B., and Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews* 18, 306-360.

Radicella, J. P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M. S., and Boiteux, S. (1997). Cloning and characterization of *hOGG1*, a human homolog of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8010-8015.

Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Gebel, S., Auer, H., Bruder, J., Rapp, U., Angel, P., Rahmsdorf, H., and Herrlich, P. (1993). UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO J.* 12, 1005-1012.

Radman, M. (1976). An endonuclease from *Escherichia coli* that introduces single polynucleotide chain scissions in ultraviolet-irradiated DNA. *Journal of Biological Chemistry* 251, 1438-1445.

Ramaswamy, N. T., Ronai, Z., and Pelling, J. C. (1998). Rapid activation of JNK1 in UV-B irradiated epidermal keratinocytes. *Oncogene* 16, 1501-1505.

Ramotar, D., Belanger, E., Brodeur, I., Masson, J. Y., and Drobetsky, E. A. (1998). A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Journal of Biological Chemistry* 273, 21489-21496.

Ramotar, D., Popoff, S. C., Gralla, E. B., and Demple, B. (1991a). Cellular role of yeast Apn1 apurinic endonuclease/3'-diesterase: repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation. *Mol Cell Biol* *11*, 4537-44.

Reagan, M. S., Pittenger, C., Siede, W., and Friedberg, E. C. (1995). Characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* with a deletion of the *RAD27* gene, a structural homolog of the *RAD2* nucleotide excision repair gene. *J Bacteriol* *177*, 364-371.

Regan, J. D., and Setlow, R. B. (1974). Two forms of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogens and mutagens. *Cancer Research* *34*, 3318-3325.

Rempola, B., Kaniak, A., Migdalsky, A., Rytka, J., Slonimski, P. P., and di Rago, J.-P. (2000). Functional analysis of *RRD1* (YIL153w) and *RRD2* (YPL152w), which encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* *262*, 1081-1092.

Robert, C., Muel, B., Benoit, A., Dubertret, L., Sarasin, A., and Stary, A. (1996). Cell survival and shuttle vector mutagenesis induced by ultraviolet A and ultraviolet B radiation in a human cell line. *Journal of Investigative Dermatology* *106*, 721-728.

Robins, P., Jones, C. J., Biggerstaff, M., Lindahl, T., and Wood, R. D. (1991). Complementation of DNA repair in *xeroderma pigmentosum* group A cell extracts by a protein with affinity for damaged DNA. *EMBO J.* *10*, 3913-3921.

Rocchi, S., Tartare-Deckert, S., Sawka-Verhelle, D., Gamba, A., and Van Obbergen, E. (1996). Interaction of SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2 with the insulin-like growth factor receptor: studies of the domains involved using the yeast two-hybrid system. *Endocrinology* *137*, 4944-4952.

Ronne, H., Calberg, M., Hu, G. Z., and Nehlin, J. O. (1991). Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology* *11*, 4876-4884.

Rosenstein, B. S., Ducore, J. M., and Cummings, S. W. (1983). The mechanism of bilirubin-photosensitized DNA strand breakage in human cells exposed to phototherapy light. *Mutation Research* 112, 397-406.

Rothblatt, J. A., Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Daum, G., and Schekman, R. (1989). Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* 109, 2641-2652.

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.

Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., and Bukau, B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* 16, 1501-1507.

Ruis, H., and Schüller, C. (1995). Stress signaling in yeast. *BioEssay* 11, 959-965.

Ruiz-Rubio, M., and Bockrath, R. (1989). On the possible role of cytosine deamination in the delayed photoreversal mutagenesis targeted at thymine-cytosine dimers in *E. coli*. *Mutation Research* 210, 93-102.

Rupert, C. S. (1962). Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. II. Formation of the enzyme-substrate complex. *J. Gen. Physiol.* 45, 725-741.

Ryter, S. W., and Tyrrell, R. M. (1998). Singlet molecular oxygen: a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radical Biology and Medicine* 24, 1520-1534.

Sage, E., Lamolet, B., Brulay, E., Moustacchi, E., Chteauneuf, A., and Drobetsky, E. A. (1996). Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 176-180.

Sambrook, J., Fritsh, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning - A laboratory manual*, C. S. H. L. Press, ed. (New York: Cold Spring Harbor).

Sancar, A., Franklin, K. A., and Sancar, G. B. (1984). *Escherichia coli* DNA photolyase stimulate UvrABC excision nuclease *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 7397-7401.

- Sancar, A., and Rupp, W. D. (1983). A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell* 33, 249-260.
- Sancar, G. B. (1990). DNA photolyases: physical properties, action mechanism, and roles in dark repair. *Mutation Research* 236, 147-160.
- Sancar, G. B., and Smith, F. W. (1989). Interactions between yeast photolyase and nucleotide excision repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Biology* 9, 4767-4776.
- Sander, M., and Huang, S. M. (1995). Characterization of the nuclease activity of *Drosophila* Rrpl on phosphoglycolate- and phosphate-modified DNA 3'-termini. *Biochemistry* 34, 1267-1274.
- Sato, K., and Yoshikawa, K. (1992). Simple system to irradiate cultured cells with UVA light. *Acta Dermato Venereologica (Stockholm)* 72, 98-101.
- Saxton, T. M., Henkemeyer, M., Gasca, S., Shen, R., Rossi, D., Shalaby, F., Feng, G., and Pawson, T. (1997). Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. *EMBO J.* 16, 2352-2364.
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Briviba, K., and Sies, H. (1993). Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Letters* 331, 304-306.
- Schinkel, A. H., and Borst, P. (1991). Multidrug resistance mediated by P-glycoproteins. *Semin. Cancer. Biol.* 2, 213-226.
- Schwarz, T., and Luger, T. A. (1989). Effect of UV irradiation on epidermal cell cytokine production. *Photochem. & Photobiol.* 4, 1-13.
- Scott, A. D., Neishabury, M., Jones, D. H., Reed, S. H., Boiteux, S., and Waters, R. (1999). Spontaneous mutation, oxidative DNA damage, and the roles of Base and Nucleotide Excision Repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 205-218.

Sebastian, J., Kraus, B., and Sancar, G. B. (1990). Expression of the yeast *PHR1* gene is induced by DNA-damaging agents. *Molecular and Cellular Biology* 10, 4630-4637.

Senturker, S., vand der Kemp, P. A., You, H. J., Doetsch, P. W., Dizdaroglu, M., and Boiteux, S. (1998). Substrate specificity of the Ntg1 and Ntg2 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* for modified bases in oxidatively damaged DNA. *Nucleic Acids Research* 26, 5270-5276.

Setlow, R. B., Grist, E., Thompson, D., and Woodhead, A. D. (1993). Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6666-6670.

Setlow, R. B., and Woodhead, A. D. (1994). Temporal changes in the incidence of malignant melanoma: explanation from action spectra. *Mutation Research* 307, 365-374.

Setlow, J. K. (1966). The molecular basis of biological effects of ultraviolet radiation and photoreactivation. *Curr. Top. Radiat. Res.* 2, 195-248.

Shennan, M. G., Palmer, C. M., and Schellhorn, H. E. (1996). Role of Fapy glycosylase and UvrABC excinuclease in the repair of UVA (320-400) mediated DNA damage. *Photochem. & Photobiol.* 63, 68-73.

Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. (1983). *Methods in yeast genetics*, C. S. H. L. Press, ed. (New York: Cold Spring Harbor).

Shibutani, S., Takeshita, M., and Grollman, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349, 431-434.

Shiota, S., and Nakayama, H. (1997). UV endonuclease of *Micrococcus luteus*, a cyclobutane pyrimidine dimer-DNA glycosylase/abasic lyase: cloning and characterization of the gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 593-598.

Sijbers, A. M., de Laat, W. L., Ariza, R. R., Biggerstaff, M., Wei, Y.-F., Moggs, J. G., Carter, D. C., Shell, B. K., Evans, E., de Jong, M. C., Rademakers, S., de Rooij, J., Jasper, N. G. J., Hoeijmakers, J. H. J., and Wood, R. D. (1996). *Xeroderma pigmentosum* group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell* 86, 811-822.

Singhal, R. K., Prasad, R., and Wilson, S. H. (1995). DNA polymerase beta conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract. *Journal of Biological Chemistry* 270, 949-957.

Smith, P. J., and Paterson, M. C. (1980). Defective DNA repair and increased lethality in ataxia telangiectasia cells exposed to 4-nitroquinoline 1-oxide. *Nature* 287, 747-749.

Sneddon, A. A., Cohen, P. T. W., and Stark, M. J. R. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes. *EMBO J.* 9, 4339-4346.

Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224.

Stanley, J. S., Lay, J. O. J., Miller, D. W., and DeLuca, D. C. (1989). Identification of the glutathione conjugate of 4-nitroquinoline 1-oxide formed in the reaction catalyzed by murine glutathione transferases. *Carcinogenesis (Lond)* 10, 587-591.

Stanley, J. S., York, J. L., and Benson, A. M. (1992). Nitroreductases and glutathione transferases that act on 4-nitroquinoline 1-oxide and their differential induction by butylated hydroxyanisole in mice. *Cancer Research* 52, 58-63.

Stark, M. J. R. (1996). Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast* 12, 1647-1675.

Stary, A., and Sarasin, A. (1996). The genetic basis of *xeroderma pigmentosum* and trichothiodystrophy syndromes. *Cancer Surv.* 26, 155-171.

Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M., and Herrlich, P. (1989). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Molecular and Cellular Biology* 9, 5169-5181.

Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M., and Herrlich, P. (1989). UV-induced DNA damages is an intermediate step in UV-induced expression of human immuno-deficiency virus type I, collagenase, c-fos, and methallothionein. *Molecular and Cellular Biology* 9, 5169-5181.

Stewart, M. S., Cameron, G. S., and Pence, B. C. (1996). Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture. *Journal of Investigative Dermatology* *106*, 1086-1089.

Stortz, G., Tartaglia, L. A., and Ames, B. N. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* *248*, 189-194.

Sugasawa, K., Ng, J. M. Y., Masutani, C., van der Spek, P. J., Eker, A. P. M., Hanaoike, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. J. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol. Cell* *2*, 223-232.

Sugimura, T., Okabe, K., and Endo, H. (1965). The metabolism of 4-nitroquinoline 1-oxide. I. Conversion of 4-nitroquinoline 1-oxide to 4-aminoquinoline 1-oxide by rat liver enzymes. *GANN* *56*, 489-501.

Sugimura, T., Okabe, K., and Nagao, M. (1966). The metabolism of 4-nitroquinoline-1-oxide, a carcinogen. 3. An enzyme catalyzing the conversion of 4-nitroquinoline-1-oxide to 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide in rat liver and hepatomas. *Cancer Research* *26*, 1717-1721.

Suquet, C., and Smerdon, M. J. (1993). UV damage to DNA strongly influences its rotational setting on the histone surface of reconstituted nucleosomes. *Journal of Biological Chemistry* *268*, 23755-23757.

Svejstrup, J., Vichi, P., and Egly, J.-M. (1996). The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH. *Trends Biochem Sci.* *21*, 346-350.

Swanson, R. L., Morey, N. J., Doetsch, P. W., and Jinks-Robertson, S. (1999). Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* *19*, 2929-2935.

Sweigert, S. E., Rowley, R., Warters, R. L., and Dethlefsen, L. A. (1988). Cell cycle effect on the induction of DNA double-strand breaks by X rays. *Radiation Research* *116*, 228-244.

Tada, M., and Tada, M. (1971). Interaction of a carcinogen, 4-nitroquinoline-1-oxide, with nucleic acids: chemical degradation of the adducts. *Chem.-Biol. Interact.* *3*, 225-229.

Tada, M., and Tada, M. (1976). Main binding sites of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide in nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 454, 558-566.

Tada, M., and Tada, M. (1974). Requirement of L-serine for enzymic activation of carcinogen, 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *GANN* 65, 281-284.

Tada, M., and Tada, M. (1975). Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Nature* 255, 510-512.

Taylor, J. S., Garrett, D. S., Brockie, I. R., Svoboda, D. L., and Telser, J. (1990). ¹H NMR assignment and melting temperature study of cis-syn and trans-syn thymine dimer containing duplexes of d(CGTATTATGC).d(GCATAATACG). *Biochemistry* 29, 8858-8866.

Taylor, J. S., Garrett, D. S., and Cohrs, M. P. (1988). Solution-state structure of the Dewar pyrimidinone photoproduct of thymidyl-(3'----5')-thymidine. *Biochemistry* 27, 7206-7215.

Taylor, J. S., and O'Day, C. L. (1990). cis-syn thymine dimers are not absolute blocks to replication by DNA polymerase I of *Escherichia coli in vitro*. *Biochemistry* 29, 1624-1632.

Teng, Y., and Waters, R. (2000). Excision repair at the level of the nucleotide in the upstream control region, the coding sequence and in the region where transcription terminates of the *Saccharomyces cerevisiae* MFA2 gene and the role of RAD26. *Nucleic Acids Research* 28, 1114-1119.

Teoule, R. (1987). Radiation-induced DNA damage and its repair. *International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics, Chemistry & Medicine* 51, 573-589.

Tessman, I., Denny, M. A., and Liu, S.-K. (1994). Unusual kinetics of uracil formation in single and double-stranded DNA by deamination of cytosine in cyclobutane pyrimidine dimers. *J. Mol. Biol.* 235, 807-812.

Tessman, I., Liu, S.-K., and Kennedy, M. A. (1992). Mechanism of SOS mutagenesis of UV-irradiated DNA: mostly error-free processing of deaminated cytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1159-1163.

Therrien, J. P., Rouabhia, M., Drobetsky, E. A., and Drouin, R. (1999). The multilayered organization of engineered human skin does not influence the formation of sunlight-induced cyclobutane pyrimidine dimers in cellular DNA. *Cancer Research* 59, 285-289.

Tijsterman, M., Verhage, R. A., van de Putte, P., Tasserion-de Jong, J. G., and Brouwer, J. (1997). Transitions in the coupling of transcription and nucleotide excision repair within RNA polymerase II-transcribed genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8027-8032.

Tokui, T., Inagaki, M., Nishizawa, K., Yatani, R., Kusagawa, M., Ajiro, K., Nishimoto, Y., Date, T., and Matsukage, A. (1991). Inactivation of DNA polymerase β by *in vitro* phosphorylation with protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 266, 10820-10824.

Tommasi, S., Denissenko, M. F., and Pfeifer, G. P. (1997). Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases. *Cancer Research* 57, 4727-4730.

Toone, W. M., and Jones, N. (1998). Stress-activated signalling pathways in yeast. *Genes to Cells* 3, 485-498.

Tornaletti, S., Rozek, D., and Pfeifer, G. P. (1993). The distribution of UV photoproducts along the human p53 gene and its relation to mutations in skin cancer. *Oncogene* 8, 2051-2057.

Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., and Haijai, H. (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 358, 1-3.

Tsuda, H., Yoshida, D., and Mizusaki, S. (1984). Caffeine inhibition of the metabolic activation of a carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide, in cultured Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 5, 331-334.

Tyrrell, R. M. (1996). Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight-from models to reality. *BioEssays* 18, 139-148.

Tyrrell, R. M. (1973). Induction of pyrimidine dimers in bacterial DNA by 365 nm radiation. *Photochem. & Photobiol.* 17, 69-73.

Umlas, M. E., Franklin, W. A., Chan, G. L., and Haseltine, W. A. (1985). Ultraviolet light irradiation of defined-sequence DNA under conditions of chemical photosensitization. *Photochem. & Photobiol.* 42, 265-273.

van Hoffen, A., Venema, J., Meschini, R., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. F. (1995). Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in *xeroderma pigmentosum* group C fibroblasts. *EMBO J.* 14, 360-367.

Van Hoof, C., Cayla, X., Bosch, M., Merlevede, W., and Goris, J. (1994). The phosphotyrosyl phosphatase activator of protein phosphatase 2A. A novel purification method, immunological and enzymic characterization. *Eur. J. Biochem.* 226, 899-907.

Van Hoof, C., Janssens, V., Dinisliotou, A., Merlevede, W., and Goris, J. (1998). Functional analysis of conserved domains in the phosphotyrosyl phosphatase activator. Molecular cloning of the homologues from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 37, 12899-12908.

Van Hoof, C., Sayek Aly, M., Garcia, A., Cayla, X., Cassiman, J. J., Merlevede, W., and Goris, J. (1995). Structure and chromosomal localization of the human gene of the phosphotyrosyl phosphatase activator (PTPA) of protein phosphatase 2A. *Genomics* 28, 261-272.

Venema, J., Bartosova, Z., Natarajan, A. T., van Zeeland, A. A., and L.H.F., M. (1992). Transcription affects the rate but not the extent of repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the human adenosine deaminase gene. *Journal of Biological Chemistry* 267, 8852-8856.

Vichi, P., Coin, F., Renaud, J.-P., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H. J., Moras, D., and Egly, J.-M. (1997). Cisplatin- and UV-damaged DNA lure the basal transcription factor TFIIF/TBP. *EMBO J.* 16, 7444-7456.

Vile, G. F., Tanew-Iliitschew, A., and Tyrrell, R. M. (1995). Activation of NF-kappa B in human skin fibroblasts by the oxidative stress generated by UVA radiation. *Photochem. & Photobiol.* 62, 463-468.

Vile, G. F., and Tyrrell, R. M. (1993). Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *Journal of Biological Chemistry* 268, 14678-14681.

Walker, I. G., and Sridhar, R. (1976). The formation and repair of single-strand breaks in DNA of cultured mammalian cells treated with UV-light, methylating agents or 4-nitroquinoline 1-oxide. *Chem. -Biol. Interactions* 12, 229-239.

Wallace, S. S. (1998). Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiation Research* 150, S60-79.

Ward, J. F. (1990). The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *International Journal of Radiation Biology* 57, 1141-1150.

Watanabe, M., Maher, V. M., and McCormick, J. J. (1985). Excision repair of UV- or benzo[a]pyrene diol epoxide-induced lesions in xeroderma pigmentosum variant cells is 'error free'. *Mutation Research* 146, 285-294.

Wei, H., Ca, Q., Rahn, R., Zhang, X., Wang, Y., and Lebwohl, M. (1998). DNA structural integrity and base composition affect ultraviolet light-induced oxidative DNA damage. *Biochemistry* 37, 6485-6490.

Wei, H., Cai, Q., Rahn, R., and Zhang, X. (1997). Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254 nm) radiation-induced formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA. *Free Radical Biol. Med.* 23, 148-154.

Wellinger, R., and Thoma, F. (1997). Nucleosome structure and positioning modulate nucleotide excision repair in the non-transcribed strand of an active gene. *EMBO J.* 16, 5046-5056.

Wilson, D. M., and Thompson, L. H. (1997). Life without DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12754-12757.

Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* 82/83, 969-974.

- Witkin, W. M. (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* *40*, 869-907.
- Wlaschek, M., Briviba, K., Stricklin, G. P., Sies, H., and Scharffetter-Kochanek, K. (1995). Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J. Invest. Dermatol.* *104*, 194-198.
- Wood, R., and Shivhi, M. K. (1997). Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes? *Carcinogenesis* *18*, 605-610.
- Woods, C. G. (1998). DNA repair disorders. *Arch Dis Child* *78*, 178-184.
- Wu, A. L., and Moye-Rowley, W. S. (1994). *GSH1*, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular and Cellular Biology* *14*, 5832-5839.
- Wu, X., and Levine, A. J. (1994). The structure of the free radical produced from carcinogenic 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 3602-3606.
- Wu, X., Li, J., Li, X., Hsieh, C., Burgers, P., and Lieber, M. (1996). Processing of branched DNA intermediates by a complex of human FEN-1 and PCNA. *Nucleic Acids Research* *24*, 2036-2043.
- Yacoub, A., Kelley, M. R., and Deutsch, W. A. (1997). The DNA repair activity of human redox/repair protein APE/Ref-1 is inactivated by phosphorylation. *Cancer Research* *57*, 5457-5459.
- Yaglom, J. A., Goldberg, A. L., Finley, D., and Sherman, M. Y. (1996). The molecular chaperone Ydj1 is required for the p34^{CDC28}-dependent phosphorylation of the cyclin Cln3 that signals its degradation. *Molecular and Cellular Biology* *16*, 3679-3684.
- Yajima, H., Takao, M., Yasuhira, S., Zhao, J. H., Ishii, C., Inoue, H., and Yasui, A. (1995). A eukaryotic gene encoding an endonuclease that specifically repairs DNA damage by ultraviolet light. *EMBO J.*, 2393-2399.

Yamamoto, K., Inoue, S., and Kawanishi, S. (1993). Site-specific DNA damage and 8-hydroxydeoxyguanosine formation by hydroxylamine and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in the presence of Cu(II): Role of active oxygen species. *Carcinogenesis* *14*, 1397-1401.

Yamane, T., Wyluda, B. J., and Shulman, R. G. (1967). Dihydrothymine from UV-irradiated DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *58*, 439-442.

Yano, T., Takahashi, S., and Ichikawa, T. (1995). Active oxygen generated in the process of carcinogen metabolism can induce oxidative damage in nuclei. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* *87*, 367-370.

Yap, W. Y., and Kreuzer, K. N. (1991). Recombination hotspots in bacteriophage T4 are dependant on replication origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 6043-6047.

Yasuhira, S., and Yasui, A. (1992). Visible light-inducible photolyase gene from the goldfish *Carassius auratus*. *Journal of Biological Chemistry* *267*, 25644-25647.

Yasui, A., Eder, A. P. M., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M., and Oikawa, A. (1994). A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *EMBO J.* *13*, 6143-6151.

Yasui, A., and McCready, S. J. (1998). Alternative repair pathways for UV-induced DNA damage. *BioEssays* *20*, 291-297.

Yeung, A. T., Mattes, W. B., Oh, E. Y., and Grossman, L. (1983). Enzymatic properties of purified *Escherichia coli* uvrABC proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *80*, 6157-6161.

Zamansky, G. B., and Chou, I. N. (1987). Environmental wavelenghts of ultraviolet light induce cytoskeletal damage. *Journal of Investigative Dermatology* *89*, 603-606.

Ziegler, A., Leffell, D. J., Subrahmanyam, K., Sharma, H. W., Gailani, M., Simon, J. A., Halperin, A. J., Baden, H. P., Shapiro, P. E., Bale, A. E., and Brash, D. E. (1993). Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 4216-4220.

Zou, Y., Crowley, D. J., and Van Houten, B. (1998). Involvement of molecular chaperonins in nucleotide excision repair. *Journal of Biological Chemistry* 273, 12887-12892.