

Université de Montréal

Mécanismes de résistance cellulaires de *Saccharomyces cerevisiae* face à la
bléomycine, un agent antitumoral; implication du gène *IMP2*.

Par
Anick Leduc

Programme de Microbiologie-immunologie
Faculté de médecine de l'université de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Science (M. Sc.)
en Microbiologie-immunologie

Décembre 2001

© Anick Leduc, 2001



W

4

U58

2002

V.048

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Mécanismes de résistance cellulaires de *Saccharomyces cerevisiae* face à la
bléomycine, un agent antitumoral; implication du gène *IMP2*.

présenté par :
Anick Leduc

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Elliot Drobetsky
Président-rapporteur

Dindial Ramotar
directeur de recherche

Éric Milot
membre du jury

Résumé en français

La protéine Imp2 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est un activateur de transcription qui est requis pour initier une réponse protectrice contre les stress salins et oxydants. Un mutant *imp2Δ* est sensible aux ions monovalents sodium et lithium, et aux ions divalents calcium, cuivre, zinc et manganèse. De plus, un mutant *imp2Δ* est hypersensible aux agents oxydants incluant le peroxyde d'hydrogène et l'agent antitumoral, bléomycine.

Cet agent xénobiotique est activé par une liaison simultanée au fer et à l'O₂ et provoque une situation de stress oxydant dans la cellule en produisant des dérivés oxygénés réactifs. La bléomycine attaque directement l'ADN, mais peut aussi endommager l'ARN et la paroi cellulaire.

Afin de caractériser le mode de détection du stress oxydant par Imp2, nous avons comparé la structure/fonction d'Imp2 avec celle de l'activateur de transcription Yap1, bien connu pour son implication en réponse au stress oxydant. Une mutagenèse dirigée sur les 5 résidus cystéines d'Imp2 a été effectuée. Les résultats ont démontré que contrairement à Yap1, les cystéines contenues dans Imp2 ne sont pas nécessaires à sa fonction antioxydante.

Puisque la bléomycine endommage la paroi cellulaire, nous avons investigué la possibilité d'un rôle potentiel d'Imp2 au niveau de la paroi cellulaire ou de protéines impliquées à ce niveau. Nous avons d'abord comparé phénotypiquement un mutant *gas1Δ* (défaut dans l'organisation de la paroi cellulaire) avec un mutant *imp2Δ* face à des agents nécessitant une paroi cellulaire fonctionnelle pour la survie cellulaire. Les résultats ont démontré qu'Imp2 pourrait jouer un rôle mineur au niveau de la paroi cellulaire, mais dans une voie de signalisation différente de celle de Gas1. La recherche de cibles transcriptionnelles d'Imp2 nous a menée à la découverte de l'activateur de transcription Yap1. La surexpression de Yap1 complémente un mutant *imp2Δ* face à la bléomycine, cependant, il semble que la complémentation de *imp2Δ* par Yap1 nécessite la présence de Gas1.

Mots clés :

Stress oxydant, Bléomycine, Imp2, cystéines, paroi cellulaire, Gas1, transcription, Yap1, voie de signalisation.

Résumé en anglais

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* Imp2 protein is a transcriptional activator required to initiate response against salt and oxidative stress. *Imp2* null mutants are sensitive to monovalent ions, Na⁺ and Li⁺, but also to the divalent ions Ca²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺. *imp2Δ* null mutants are also hypersensitive to oxidant including hydrogen peroxide and the antitumor drug bleomycin.

Bleomycin is activated by linking simultaneously oxygen and iron and can cause oxidative stress by producing reactive oxygen species (ros). Bleomycin can break DNA but can also attack RNA and damage cell wall.

To further characterise Imp2 function in response to oxidative stress, we compared Imp2 structure/function with the well-known yeast transcriptional activator Yap1. By site directed mutagenesis, we changed all 5 cysteine residues in Imp2 into alanine. Results show that unlikely Yap1, the cysteine residues of Imp2 do not play a role in oxidative stress response.

Since bleomycin can also damage cell wall, we ask if *imp2* could play a role at the level of cell wall. We first compared *gas1Δ* mutant (defective in the proper assembly of the cell wall) with an *imp2Δ* mutant against several drugs that require functional cell wall. Result show that Imp2 could play a minor role at the level of cell wall, but in a different pathway than Gas1. We then looked for muticopy suppressor of *IMP2* and this result in the isolation of the Yap1 transcriptional activator. Yap1 overexpression can complement an *imp2Δ* mutant against bleomycin, but complementation seems to need both Yap1 and Gas1 gene.

Key words:

Oxidative stress, Bleomycin, Imp2, Cysteine, Cell wall, Gas1, Transcription, Yap1, Signalling pathway.

Table des matières

Résumé en français	iii
Résumé en anglais.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Listes des figures	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements	xvi
I. Introduction.....	1
1.1 Le stress oxydant.....	2
1.1.1 Production des dérivés oxygénés réactifs	2
1.1.2 Les dor de source endogène.....	4
1.1.3 Les dor exogènes	4
1.2 Dommages causés par les dor	5
1.2.1 Endommagement de l'ADN.....	5
1.2.2 Dommages mitochondriaux.....	6
1.2.3 Dommages causés aux acides aminés et aux protéines	7
1.2.4 Dommages lipidiques	8
1.3 Mécanismes de détection et de protection face au stress oxydant	9
1.3.1 Pour contrer les stress oxydant et ses effets	10
1.3.1.1 Systèmes de défense non-enzymatiques	10
1.3.1.2 Systèmes de défense enzymatiques chez <i>S.cerevisiae</i>	12
1.3.2 Détection de stress oxydant et mécanismes de régulation génétique chez <i>E.coli</i>	13
1.3.3 Détection de stress oxydant et mécanismes de régulation génétique chez <i>S.cerevisiae</i>	15
1.3.3.1 Facteurs de transcription reliés au stress oxydant chez <i>S.cerevisiae</i> ..	15

1.3.4	Yap1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> est un activateur de transcription membre de la famille b-Zip.	16
1.3.4.1	Régulation de <i>YAP1</i> en réponse au stress oxydant.....	17
1.3.5	Les facteurs de transcription de cellules de mammifères et leur régulation lors de stress oxydant.	20
1.4	La bléomycine	21
1.4.1	La bléomycine, un agent oxydant et ses caractéristiques	21
1.4.1.1	La structure de la bléomycine	22
1.4.1.2	Mécanisme d'action de la bléomycine et les dommages causés aux sucres et aux bases.	23
1.4.1.3	La bléomycine peut aussi endommager l'ARN.....	24
1.4.1.4	Dommages causés à la paroi cellulaire par la bléomycine.	25
1.4.2	Internalisation de la bléomycine	25
1.4.3	La résistance à la bléomycine	26
1.5	Le gène <i>IMP2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; un activateur de transcription impliqué dans la résistance cellulaire à la bléomycine et à d'autres agents oxydants.	29
1.5.1	<i>IMP2</i> pour "Independent of Mitochondrial Particle"	29
1.5.2	<i>IMP2</i> est impliqué dans la résistance aux agents oxydants.	30
1.5.3	<i>IMP2</i> est impliqué dans le maintien de l'homéostasie ionique	30
1.5.4	La structure et les propriétés fonctionnelles de <i>IMP2</i>	31
1.6	La paroi cellulaire	33
1.6.1	Les protéines de la paroi cellulaire.....	33
1.6.2	Les β -Glucans.....	34
1.6.3	La chitine.....	34
1.7	Gas1p, une protéine impliquées dans l'organisation de la paroi cellulaire.	36
1.7.1	Description de Gas1, une protéine à ancrage GPI.....	36
1.7.2	Fonctions de la protéine Gas1p.	37
1.7.3	La famille des protéines Gas.....	37
1.8	Problématique et objectif de ce travail	39

II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	40
2.1	Souches de bactéries et de levures utilisées	41
2.2	Construction de plasmide	42
2.3	Polymerase chain réaction (PCR).....	45
2.4	Les milieux de cultures.....	46
2.5	Mutagenèse dirigée.....	46
2.6	Purification des oligonucléotides	48
2.7	Préparation des cellules compétentes et transformation de <i>E.coli</i>	50
2.8	Extraction de plasmide chez <i>E.coli</i>	51
2.9	Transformation de plasmide et délétion de gène dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
2.10	Essais de dilution.....	52
2.11	courbe de survie	53
2.12	Buvarpage western.....	53
2.13	Induction et visualisation des cellules.....	54
2.14	Pétris de gradient	55
2.15	Buvarpage northern.....	55
III.	RÉSULTATS.....	56
3.1	<i>IMP2</i> ne semble pas avoir recours à ses cystéines pour exercer sa fonction antioxydante.....	57
3.2	Les protéines Imp2 mutantes ont le même patron d'expression que la protéine sauvage	60
3.3	La localisation cellulaire (en situation de stress thermique et en condition normale) des protéines Imp2 sauvage et mutantes ne varie pas en fonction des mutations.....	61

3.4	Aucune perte de fonction de la protéine Imp2 n'est occasionnée par les mutations individuelles.....	62
3.5	Les cystéines de Imp2, mutées séparément, n'ont aucun effet sur la survie des cellules face à la bléomycine et au peroxyde d'hydrogène.....	65
3.6	Aucune combinaison de cystéines mutées n'a un effet sur la fonction de la protéine Imp2.....	67
3.7	Muter les cinq cystéines de la protéine Imp2 en même temps n'affecte pas la localisation cellulaire de la protéine dans la cellule	69
3.8	Le patron de migration de la protéine Imp2 ne varie pas lorsque ces cinq cystéines sont mutées en même temps.....	71
3.9	Implication de la protéine Imp2 au niveau de la paroi cellulaire.....	72
3.9.1	Agents nécessitant une paroi cellulaire fonctionnelle de la cellule pour la survie	74
3.10	Recherche de cibles transcriptionnelles pour Imp2 en réponse à la bléomycine.....	78
IV.	Discussion.....	82
4.1	La surexpression de la protéine Imp2 mutée dans chacune des cystéines séparément complémente un mutant <i>imp2Δ</i>	83
4.2	Aucune combinaison de cystéines mutées n'a un effet sur la fonction de la protéine Imp2.....	84
4.3	Un anticorps anti-Imp2 un projet en cours.....	85
4.4	Quels pourraient être les éléments structurels de la protéine Imp2 essentiels à sa fonction protectrice (contre le stress oxydant, salin ou thermique).....	85
4.4.1	Une activation par la phosphorylation ?.....	86
4.4.2	Imp2 est-elle Ubiquitinée.....	86
4.4.3	Une activation par une interaction protéine/protéine	87
4.5	Implication de la protéine Imp2 au niveau de la paroi cellulaire.....	87

4.5.1	Imp2 semble jouer un rôle au niveau de la paroi cellulaire	88
4.6	Recherche de cibles transcriptionnelles de Imp2 en réponse à la bléomycine	88
4.6.1	Quel pourrait être le mode d'action de Yap1.....	89
4.6.2	Gas1 nécessite-il la présence de Yap1 ?	89
4.6.3	Yap1 nécessite-il la présence de Gas1 ?	90
V.	Conclusion.....	91
	Références	96

Liste des tableaux

TABLEAU I : ACIDES AMINÉS LES PLUS SUSCEPTIBLES D'ÊTRE OXYDÉS.....	7
TABLEAU II : MÉCANISMES DE DÉFENSE NON-ENZYMATIQUES CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i> ..	11
TABLEAU III : MÉCANISMES DE DÉFENSE ENZYMATIQUES CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i>	12
TABLEAU IV : PROTÉINES LIANT LA BLÉOMYCINE (DÉFENSE ET/OU RÉSISTANCE CELLULAIRE À LA BLM ?)	26
TABLEAU V : PROTÉINES (ENZYMES) IMPLIQUÉES DANS LA RÉPARATION DE L'ADN (DÉFENSE ET/OU RÉSISTANCE CELLULAIRE À LA BLM ?).....	28
TABLEAU VI : LIAISONS CONNUES ENTRE LES MACROMOLÉCULES DE LA PAROI CELLULAIRE DE LEVURE.	34
TABLEAU VII : CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DE CERTAINS MUTANTS RÉLIÉS À LA PAROI CELLULAIRE DE LEVURE.....	35
TABLEAU VIII: SOUCHES DE BACTÉRIES ET DE LEVURES	41
TABLEAU IX : OLIGONUCLÉOTIDES UTILISÉS DANS CETTE ÉTUDE	48
TABLEAU X : CONCENTRATION DES DROGUES UTILISÉES POUR LES ESSAIS DE DILUTION ET LES PÉTRIS DE GRADIENTS.	52
TABLEAU XI : EFFETS DES MUTATIONS SUR LA LOCALISATION CELLULAIRE DE IMP2 AVEC ET SANS TRAITEMENT THERMIQUE.....	62
TABLEAU XII : RÉSUMÉ DES COMBINAISONS DE CYSTÉINES MUTÉES DANS LA PROTÉINE IMP2 ET PHÉNOTYPE DE RÉSISTANCE À LA BLÉONMYCINE. 68	

Listes des figures

FIGURE1A ET B : RÉGULATION ENZYMATIQUE PAR OXYR ET SOXR/S CHEZ <i>E. COLI</i> EN RÉPONSE AU STRESS OXYDANT.....	14
FIGURE2 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU GÈNE <i>YAPI</i> DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	16
FIGURE3 : SCHÉMA DE LA RÉGULATION DE <i>YAPI</i> LORS DE STRESS OXYDANT.	19
FIGURE4 : SCHÉMA DE LA STRUCTURE DE LA BLÉOMYCINE.....	22
FIGURE5 : MÉCANISME POSSIBLE D'ACTIVATION DE LA BLÉOMYCINE RÉGÉNÉRATION DU FER).....	23
FIGURE 6 : SCHÉMA DE LA STRUCTURE DE LA PROTÉINE <i>IMP2</i>	32
FIGURE7 : SCHÉMA DE LA STRUCTURE DES PROTÉINES DE LA FAMILLE GAS	38
FIGURE8 : SCHÉMA DES PLASMIDES UTILISÉS DANS CETTE ÉTUDE.....	44
FIGURE9 : ESSAIS DE DILUTION MESURANT LA SENSIBILITÉ À LA BLÉOMYCINE DE LA SOUCHE SAUVAGE, DÉLÉTÉE EN <i>IMP2Δ</i> ET DE CHACUN DES MUTANTS (<i>CYS-ALA</i>) DANS UN PLASMIDE MULTICOPIE.	59
FIGURE10 : BUWARDAGE WESTERN IDENTIFIANT LE PATRON D'EXPRESSION DE CHACUNE DES PROTÉINES <i>IMP2</i> , SAUVAGE ET MUTANTES.	60
FIGURE11 : ESSAIS DE DILUTION DE LA SOUCHE SAUVAGE, DÉLÉTÉE EN <i>IMP2Δ</i> ET DE CHACUN DES MUTANTS (<i>CYS-ALA</i>) DANS UN PLASMIDE SIMPLE COPIE.....	64
FIGURE12 : COURBE DE SURVIE DES SOUCHES SAUVAGE ET MUTANTES FACE À LA BLÉOMYCINE ET AU PEROXIDE D'HYDROGÈNE.	66
FIGURE13 : LOCALISATION CELLULAIRE DES PROTÉINES <i>IMP2</i> SAUVAGE ET MUTÉES, EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE DE STRESS THERMIQUE.....	70
FIGURE14 : BUWARDAGE WESTERN IDENTIFIANT LE PATRON D'EXPRESSION DE CHACUNE DES PROTÉINES <i>IMP2</i> , SAUVAGE ET MUTÉE.....	72
FIGURE15 : ESSAIS DE DILUTION COMPARANT LA SENSIBILITÉ DES MUTANTS <i>IMP2Δ</i> ET <i>GAS1Δ</i> FACE À DIFFÉRENTES DROGUES NÉCESSITANTS UNE PAROI CELLULAIRE INTACTE POUR LA SURVIE.....	76

FIGURE16 : PÉTRI DE GRADIENT À LA BLÉOMYCINE COMPARANT LA SENSIBILITÉ DES MUTANTS <i>IMP2Δ</i> , <i>GAS1Δ</i> ET LE DOUBLE MUTANT <i>ALY1 (IMP2Δ-GAS1Δ)</i>	77
FIGURE17 : PÉTRI DE GRADIENT DÉMONTRANT LA COMPLÉMENTATION D'UN MUTANT <i>IMP2Δ</i> PAR UNE SUREXPRESSION DU GÈNE <i>YAPI</i> FACE À LA BLÉOMYCINE.	78
FIGURE18A : PÉTRI DE GRADIENT DÉMONTRANT LA SUREXPRESSION DU GÈNE <i>YAPI</i> DANS UN MUTANT <i>GAS1Δ</i> ET LE DOUBLE MUTANT <i>ALY1 (IMP2Δ-GAS1Δ)</i> FACE À LA BLÉOMYCINE.....	79
FIGURE18B : ESSAIS DE DILUTION COMPARANT <i>IMP2Δ</i> ET <i>IMP2Δ+GAS1</i> FACE À LA BLÉOMYCINE.	80
FIGURE19 : BUVARDAGE NORTHERN REPRÉSENTANT LE NIVEAU D'EXPRESSION D'ARN DU GÈNE <i>GAS1</i> EN PRÉSENCE OU ABSENCE DE <i>YAPI</i> ET/OU DE BLÉOMYCINE.	81
FIGURE20 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU MODEL DE COMPLÉMENTATION D'UN MUTANT <i>IMP2Δ</i> PAR LA PRÉSENCE DE <i>GAS1</i> ET <i>YAPI</i> EN RÉPONSE À LA BLÉOMYCINE	94

Liste des abréviations

%	Pourcentage
°C	degré celcius
$^1\text{O}_2$	oxygène singulet
4-NQO	4-Nitroquinoline 1-oxyde
8-oxo-G	8-oxo-guanine
ADN	acide déoxyribonucléique
Ala	Alanine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP	apurinique, apyrimidique
APS	amonium persulfate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messagé
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ATP	adénosine triphosphate
BLM	Bléomycine
Ca^{2+}	Calcium
Cu^{2+}	Cuivre
Cys	Cystéine
Dor	dérivés oxygénés réactifs
DNTP	déoxynucléotides triphosphates
Dox	densité optique à un longueur d'onde x
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylène diamide tétraacétique
g	Gramme
GFP	green fluorescent protein
GPI	glycophosphatidylinositol
Grase	glutathione réductase
GRX	glutarédoxines
GSH	Glutathione
h	Heure

H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
Li ⁺	lithium
Mg	milligramme
Mg ²⁺	magnésium
MgCl ₂	chlorure de magnésium
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
Mn ²⁺	manganèse
mutant X Δ :: <i>LEU2</i>	mutant de délétionX par insertion de la cassette <i>LEU2</i>
Na ⁺	sodium
NaCl	chlorure de sodium
NAD(P)H	forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NES	nuclear export signal
NF-κβ	nuclear factor kb
ng	nanogramme
NLS	nuclear localisation signal
nm	nanomètre
O ₂ ^{•-}	radical anion superoxyde
o/n	over/night
O ₂ •	dioxygène
O ₂	oxygène
OH•	radical hydroxyl
P.E.G.	polyéthylène glycole
PCR	polymerase chain reaction
pH	potentiel hydrogène
rpm	revolution par minute

Rrase	ribonucléotide réductase
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodécyl sulfate
Sec	seconde
SER	sérine
SOD	superoxyde dismutase
TBSET	tampon tris-base, NaCl, EDTA, Tween40
TE	tampon tris-HCL/EDTA
TRX	thiorédoxine
Tyr	tyrosine
-URA	milieu minimale, sans uracile
μl	microlitre
μm	micromètre
v/v	volume/volume
VIH	virus de l'immunodéfiscience humaine
WT	wild type (sauvage)
YPD	milieu yeast extract peptone dextrose
Zn ²⁺	zinc

Remerciements

Pour terminer mon Baccalauréat, il m'a fallu faire un stage en laboratoire. Un des nombreux heureux hasards de ma vie a fait que mon premier choix de laboratoire a été refusé et qu'un jeune chercheur recherchait un étudiant. Après un bref entretien, je fus tout de suite conquise par le domaine de recherche, mais surtout par l'enthousiasme du Dr Dindial Ramotar. Suivant ces 4 mois de stage, Dindial me propose de faire ma maîtrise dans son laboratoire ce que j'accepte de faire sans trop de conviction. Cependant, durant ces trois années, Dindial a su guider mes recherches et faire renaître en moi ce goût pour la science et la découverte. Il a été du début à la fin un exemple de discipline, d'énergie et de dévouement scientifique très difficile à imiter. Ainsi, pour tout cela, je tiens à remercier le Dr Ramotar. Un merci spéciale au Dr Elliot Drobeky et au Dr Éric Milot pour avoir fait la correction de mon mémoire.

Je tiens à dire un gros merci à Carole qui au début de ma maîtrise m'a fait réaliser à quel point j'ai de l'assurance...

Un gros merci à Isabelle Brodeur avec qui j'ai partagé beaucoup plus que du temps de laboratoire...Les gens du laboratoire ont tous laissés leurs marques personnelles durant mes 4 ans de lab. Merci à mon miroir, Ratsavarinh Vongsamphanh pour nos nombreuses aventures et collaborations. Merci à Andréa pour qui je semble être la personne la plus calme au monde. Merci à Angélique, Arshad, Huijie, Xiaoming pour les conversations et les nombreux services. Une petite attention particulière pour celui avec qui j'ai eu de nombreux échanges de conscience : Pierre-Karl Fortier.

J'ai eu la chance de côtoyer au début de ma maîtrise le Dr Jean-Christophe Hoflack qui m'a gentiment et formidablement bien expliqué les bases théoriques de la biologie moléculaire. Je remercie aussi Jocelyn David qui a pris la relève en ce sens et qui a su tenir à jours mes connaissances scientifiques.

Sans oublier ma belle-mère préférée Monique qui m'encourage et me soutien et que dire d'Alex si non que je souhaite qu'il demeure toujours aussi gentil et intègre merci à vous deux.

Je voudrais dire un merci tout spécial à une personne que j'aime énormément, une personne qui a tout bouleversé dans ma vie et avec qui je peux maintenant me permettre de réaliser tous mes rêves, une personne dont les initiales font jouer la musique que seul le coeur peut entendre. Merci mon p'tit Teddy, je t'aime.

Un gros merci à mon frère qui a partagé mon passé, partage mon présent et avec qui j'espère que l'avenir sera tout aussi reluisant... Je t'aime Marc-André merci de croire en moi et gardons cette confiance mutuelle.

Finalement, je ne pourrais pas écrire ces lignes sans le travail, l'encouragement, le soutien et le dévouement (les mots me manquent) de mes parents Diane et René qui ont cru et croiront toujours en moi, je vous aime et merci du fond du coeur.

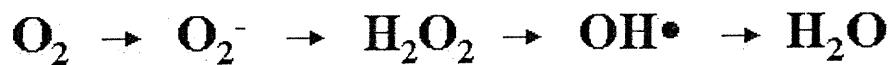
I. Introduction

1.1 Le stress oxydant

Au courant de sa vie, la cellule fait face à plusieurs types de stress ; osmotique, thermique, ionique, etc.... Cependant, il y existe une situation de stress qui risque d'affecter la cellule plus fréquemment puisque le stress peut provenir de sources endogènes ou exogènes ; il s'agit du stress oxydant. Une situation de stress oxydant dans la cellule, survient lorsqu'il y a une augmentation de dérivés oxygénés réactifs (dor) générés par des sources endogènes ou exogènes (Fridovich, 1999). Les dor, anions superoxydes et les radicaux hydroxyles $\text{OH}\bullet$, peuvent endommager une grande variété de molécules cellulaires tels : l'ADN, les protéines et les lipides (Henle et Linn, 1997).

1.1.1 Production des dérivés oxygénés réactifs

Les dérivés oxygénés réactifs peuvent provenir de deux sources, endogènes et exogènes. Lors de la respiration cellulaire, l'oxygène est métaboliser produisant des dor avant de former le produit final ; l'eau (Gutteridge, 1994).



Bien que l'enzyme cytochrome oxydase puisse en général catalyser efficacement cette série de réactions afin de produire l'eau, il se peut que quelques molécules d'O₂ soient réduites de façon monovalente et produisent des dor qui peuvent endommager la cellule. Ainsi, les dor peuvent être formés par deux réactions. La réaction de Haber-Weiss consiste en la combinaison du peroxyde d'hydrogène avec l'anion superoxyde pour produire le radical hydroxyl.



(très réactif) (Gutteridge, 1994).

Une autre réaction possible est la réaction de Fenton qui consiste en la formation ici aussi de radicaux hydroxyles, cependant par l'association fer/peroxyde d'hydrogène. (Blakely et al., 1990)



Cette réaction peut-être amorcée par la présence d'agents chélateurs, d'où la pertinence d'étudier la production et les effets des dor puisque même la faible quantité d'ions contenus dans la chromatine est suffisant pour activer la réaction de Fenton et produire des dor. Un dernier produit réactif de l'oxygène est le ¹O₂ (oxygène singulier). Bien que moins réactif que celui-ci, sa durée de vie est relativement plus longue que celle du OH• (Muller-Breitkreutz et al., 1995).

1.1.2 Les dor de source endogène

En plus de la respiration cellulaire mentionnée précédemment, les dérivés oxygénés réactifs peuvent aussi provenir d'autres sources endogènes tels ; des produits de réactions enzymatiques cellulaires (Reid et Loeb. 1992). La myéloperoxydase des neutrophiles convertit le peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux, un composé oxydant. Les lymphocytes B quant à eux, catalysent la réaction de O_2^- par le NADPH et peuvent former des réactifs 1O_2 . De nombreuses autres réactions enzymatiques sont à l'origine de la production de dor et ont été caractérisées et associées à certaines maladies humaines. En exemple, nous pouvons citer la production d'oxyde nitrique ; un produit semblable au $OH\bullet$ provenant de l'enzyme synthase d'oxyde nitrique et qui semble être impliquées dans l'apparition de plaques athérosclérotiques (Beckman et al., 1990). Une dernière enzyme bien caractérisée, produit des dor lors de la conversion de la xanthine en acide urique, il s'agit de la xanthine oxydase. Un mauvais fonctionnement de cette enzyme est associé à l'apparition de l'arthrite (Aruoma et al., 1989).

1.1.3 Les dor exogènes

En plus des sources endogènes de dor, il arrive que les cellules soient exposées à des produits exogènes causant la production de dor. La source la mieux caractérisée est la radiation ionisante qui, par la radiolyse de l'eau, produit des radicaux hydroxyles hautement réactifs (Hutchinson, 1985). Aussi, la médecine moderne nous a confronté à de nouvelles sources de dor exogènes. En effet, certains agents xénobiotiques tels la bléomycine et la mitomycine C utilisées dans le traitement de certains cancers, peuvent réagir avec le fer endogène et produire des dor (Linn et al., 1988 B).

1.2 Dommmages causés par les dor

Les dérivés oxygénés réactifs provenant de chacune des sources ; endogène et exogène, peuvent endommager irrémédiablement les cellules. En effet, les dor sont susceptibles d'endommager plusieurs constituants cellulaires dont : l'ADN, les mitochondries, les protéines et les lipides.

1.2.1 Endommagement de l'ADN.

Il existe plus de 100 variétés de dommages causés à l'ADN par les dor (Radicella et al., 1997). La plupart des lésions sont réparées dans les cellules par des enzymes de type ADN glycosylase (Takao et al., 1998). L'enzyme endonucléase III de la bactérie *Escherichia coli* est la principale ADN glycosylase (enlève les pyrimidines oxydées) et est très bien conservée de la bactérie à l'humain. (Hilbert et al., 1997)

Les dor peuvent causer des dommages aux bases (Ward, 1988), aux sucres (Demple et Harrison 1994), créer des bris simple brin de l'ADN et aussi causer la formation de sites abasiques (sites-AP, Apurinique/apyrimidique) (Takao et al., 1998). Les dommages à l'ADN provoqués par les dor les plus fréquents sont les 8-hydroxyguanines et les 8-oxoguanines (8 oxo-G) qui sont réparés par les protéines produites par les gènes Mut T et Mut M/Fpg. Lorsqu'il y a une adénine mésappariée à une lésion 8-oxo-G, c'est le produit de MutY qui s'en charge. Il existe des homologues de MutT et Mut Y chez l'humain, il n'existe cependant qu'un homologue fonctionnel de Mut M/Fpg chez l'humain appelé OGG1. Les enzymes ADN glycosylases elles-mêmes, dans le processus de réparation engendrent un nouveau type de dommage que celui qu'elles tentent de réparer. Par exemple, lorsqu'il y a un enlèvement d'une base endommagée par l'enzyme endonucléase III, il en résulte un site abasique, site AP qui doit aussi être réparé car celui-ci bloque la réplication de

l'ADN (Kozarich et al., 1993). Ces lésions sont donc réparées par les AP endonucléases, des enzymes très bien caractérisées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et également bien conservées dans l'évolution (humain, *HAP1*) (Barzilay et al., 1995).

1.2.2 Domages mitochondriaux

Les mitochondries sont le siège de la respiration cellulaire et donc, de se fait, constamment en contact avec des dor (Takao et al., 1998). L'ADN mitochondrial est donc la cible de ces dor et des altérations de l'ADN mitochondrial seraient responsables du vieillissement et de certaines maladies associées au vieillissement telles : la maladie de Parkinson et l'Alzheimer (Zorov, 1996). Ainsi, les mitochondries ont besoin de bons enzymes de réparation de l'ADN. En effet, il existe dix fois plus de lésions 8 oxo-G dans l'ADN mitochondrial que dans l'ADN nucléaire (Richter et al., 1995). On retrouve donc des enzymes tels endonucléase III, et Ap- endonucléase dans les mitochondries (Linn et al., 1988). On a aussi observé de l'activité de recombinaison dans les mitochondries (Thyagarajan et al., 1996). La majorité des dommages causés aux mitochondries sont des mutations dans l'ADN mitochondrial: celles-ci peuvent avoir pour effet, d'inhiber l'utilisation de la respiration comme sources d'énergie par la cellule. Il existe deux types de mutations fréquemment observées, le premier nommé *mit⁻* qui affecte une seule fonction et le deuxième nommé *Rho⁻* qui consiste en une large délétion éliminant d'un coup la synthèse protéique provoquant la formation de colonies appelées "petites ou *Rho⁻*". Les *Rho⁻* peuvent être facilement induites par un grand nombre d'agents. (Fox et al., 1991)

1.2.3 Domages causés aux acides aminés et aux protéines

Les dor peuvent endommager les protéines en causant des modifications aux chaînes latérales d'acides aminés, cela créé par la suite, la formation de liens croisés (cross-linking) entre deux protéines de même que la fragmentation du support du polypeptide (backbone). (Berlett et Stadtman, 1997)

D'abord, on retrouve l'oxydation du "backbone" de la protéine générant des radicaux à carbone central qui peuvent ensuite réagir avec d'autre pour former des protéines liées par leurs carbones centraux. De plus, il peut y avoir bris du lien peptidique de la protéine causé par une attaque de la chaîne d'acides aminés latérale des composés glutamyls, aspartyls et prolyls. (Berlett et Stadtman, 1997). Les dommages causés aux protéines peuvent aussi être la conséquence des modifications que les dor exercent sur les acides aminés. (tableau I) (Berlett et Stadtman, 1997)

Tableau I : Acides aminés les plus susceptibles d'être oxydés

Acides aminés	Produit de l'oxydation des acides aminés
Cystéine	Pont dissulfure, acide cystéique
Méthionine	Sulfoxyde et sulfone de méthionine,
Tryptophane	Nitrotryptophan , formylkynurinine, 3-hydroxykynurinine, Kynurénine, , 2-,4-,5-,6-,et 7-hydroxytryptophane
Phénylalanine	2-,3-, et 4-hydroxyphénylalanine, 2,3-dihydroxyphénylalanine
Tyrosine	Nitrotyrosine croisées, Tyr-O-Tyr, croisement Tyr-Tyr, 3,4-Dihydroxyphénylalanine
Histidine	Acide aspartique, asparagine, 2-Oxohistidine
Arginine	Semialdéhyde glutamique
Lysine	Semialdéhyde α - aminoadipique
Proline	2- pyrrolidone, acide 4 et 5- hydroxyproline pyroglutamique, semialdéhyde glutamique
Thréonine	Acide 2-Amino-3-kétobutirique
Glutamyl	Acide oxalique, acide pyruvique

Les protéines oxydées ou endommagées ont tendance à être plus rapidement éliminées par les protéases que des protéines endommagées par un autre stress. (Stadtman, 1990). Les dommages causés aux protéines sont le résultat d'une oxydation de certains acides aminés empêchant la protéine d'atteindre la bonne conformation. (Dean et al., 1993). Une protéine ayant un mauvais repliement, peut ne pas être en mesure d'effectuer sa fonction, mais aussi interagir avec d'autres protéines et les endommager. Les protéines les plus susceptibles d'être endommagées par le stress oxydant chez la bactérie *E.coli* de même que chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Cabiscole et al., 2000) sont ; l'enzyme alcool déshydrogénase E (croissance anaérobique), le facteur d'élongation G, la protéine de choc thermique (heat shock) ADN K, la protéine A liant l'oligopeptide, la sous unité β de l'ATPase F_0F_1 , l'énolase et la protéine de la membrane externe A. (Tamarit et al., 1998).

1.2.4 Dommages lipidiques

Les dérivés oxygénés réactifs peuvent également endommager les macromolécules cellulaires avec une création de dommages presque aussi importante que ceux causés à l'ADN. (Marnett., 2000) Les résidus d'acides gras polyinsaturés des phospholipides sont extrêmement sensibles au stress oxydant.

Ainsi, lors de stress oxydant, les membranes cellulaires, composés de lipides, sont assujetties à subir des dommages. Comme plusieurs de ces phospholipides sont polyinsaturés, la présence de groupes méthylés entre deux liens d'acide gras les rendent très sensible aux oxydants (Porter et al., 1995). De plus, il a été démontré que la forte concentration d'acide gras polyinsaturés n'est pas uniquement la cible des agents oxydants, mais peut aussi renforcer leurs actions. En effet, les acides gras polyinsaturés, permettent la création de plusieurs autres dérivés oxygénés réactifs susceptibles d'endommager d'autres éléments cellulaires tels ; l'ADN. Par exemple, pour une seule réaction d'oxydation, on peut observer la disparition de jusqu'à 60 molécules d'acide linoléique (le plus commun des acides gras polyinsaturés cellulaire) de même que jusqu'à 200 molécules d'acide arachidonique (Marnett., 2000).

La cellule peut heureusement compter sur un bon système antioxydant pour protéger ses constituants de l'oxydation. Ce système est composé de petites molécules antioxydantes telles : la vitamine C et E et des enzymes comme la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathione peroxydase (Grant., 2001).

Puisque la production de dérivés oxygénés réactifs est un processus constant, il se peut que les systèmes antioxydants soient défaillants et que la peroxydation des lipides ait lieu. Ainsi, lorsque le premier oxydant réagit avec les lipides, le premier produit formé est l'hydroxyde de lipide. Ces composés ont une durée de vie assez courte pouvant être réduit par la glutathione peroxydase en alcool gras non-réactifs. Les hydroxydes de lipide peuvent cependant réagir avec des ions métalliques pour former d'autres dérivés toxiques (réactifs) tels ; les époxydes et aldéhydes. Le malodialdéhyde (MDA) qui est mutagène pour l'ADN et le 4-hydroxynonénale (HNE) qui est toxique et impliqué dans la signalisation, sont les plus communs (Marnett., 2000).

1.3 Mécanismes de détection et de protection face au stress oxydant

Comme vue précédemment, les dor peuvent engendrer beaucoup de dommages aux différents éléments cellulaires. Ces dommages peuvent mener à l'apparition de mutation dans l'ADN pouvant causer le cancer et même la mort cellulaire. De plus, d'autres maladies sont aujourd'hui associées à une accumulation de dommages et/ou de mutations causés par les dor dans la cellule : la sclérose amyotrophique latérale, l'Alzheimer, le syndrome de détresse respiratoire, la dystrophie musculaire et le syndrome de Werner (Berlett et al., 1997). De plus, les dommages causés par les dérivés oxygénés réactifs, sont aussi associés au vieillissement.

Puisque les dor peuvent engendrer autant de dommages, la cellule possède plusieurs mécanismes pour détecter le stress oxydant, pour l'éliminer et bien sur, pour réparer les dommages déjà causés.

1.3.1 Pour contrer les stress oxydant et ses effets

Les cellules possèdent des mécanismes de défense contre le stress oxydant qui peuvent être classés dans deux catégories, les systèmes enzymatiques et non-enzymatiques.

1.3.1.1 Systèmes de défense non-enzymatiques

Les systèmes de défense non-enzymatiques sont de petites molécules solubles soit dans l'eau ou selon les circonstances, dans les lipides, Ils agissent en général comme agrippeurs de dor. Étant oxydés par les dor libres, les molécules débarrassent la cellule de ceux-ci. Plusieurs de ces mécanismes non-enzymatiques sont énumérés dans le tableau II.

Tableau II : Mécanismes de défense non-enzymatiques chez *S. cerevisiae*.

Description des molécules	Fonction et/ou caractéristiques spécifiques
Glutathione (GSH) : un tripeptide (γ -L-glutamyl-L-cystinylglycine) codé par <i>GSH1</i>	GSH agit avec les dor et devient réduite. (GSH=GssG _{réduite}) impliqué dans la protection des mitochondries
Acide ascorbique (vitamine C)	Important antioxydant conservé dans l'évolution
Polyamine -Spermine -Spermidine	Essentielles pour la croissance aérobie, un mutant <i>spe2Δ</i> est hypersensible à l'O ₂
Antioxydant liposoluble	La composition lipidique des membranes de levure est importante dans la résistance aux stress oxydants ; une membrane ayant plus de gras saturés est plus résistante que celle contenant plus de gras polyinsaturés. (Steels et al., 1994)
Métallothionéines Petites protéines riches en cystéines pouvant lier plusieurs différents ions métalliques. Codé par <i>CUP1</i> et <i>CRS5</i>	La liaison de ces métallothionéines avec les ions métalliques empêche ceux-ci d'être impliqués dans les réactions de production de dor
Thiorédoxine Petite protéine riche en sulfhydryl Codé par <i>TRX1</i> et <i>TRX2</i>	Agissent comme réducteurs des enzymes thiorédoxine peroxydase et ribonucléotide réductase.
Glutarédoxine Petite protéine dont le site actif est composé de deux cystéines redox-sensible. Codé par <i>GRX1</i> et <i>GRX2</i>	Ces molécules agissent de la même façon que la thiorédoxine, mais peuvent aussi fournir des électrons à la ribonucléotide réductase. <i>GRX1</i> protège contre le H ₂ O ₂ <i>GRX2</i> protège contre les anions superoxydes.

Informations recueillies dans (Jamieson. , 1998)

1.3.1.2 Systèmes de défense enzymatiques chez *S.cerevisiae*.

La cellule possède également un système de défense enzymatique capable de capter les dor., leurs produits et/ou de réparer les dommages causés par les dor. Ces systèmes enzymatiques interagissent avec les systèmes non-enzymatiques énoncés précédemment tels la thiorédoxine. Plusieurs de ces mécanismes enzymatiques sont énumérés dans le tableau III.

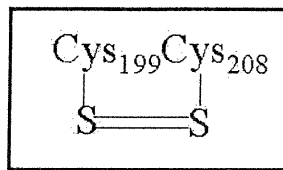
Tableau III : Mécanismes de défense enzymatiques chez *S. cerevisiae*.

Enzymes	Fonction et/ou caractéristiques spécifiques
Catalases Catalase A Localisé dans le peroxysome Codé par <i>CTA1</i> Catalase T Localisé au cytosol Codé par <i>CTT1</i>	Impliqués dans la détoxification du H ₂ O ₂ $H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$
Superoxyde dismutase SOD Localisé dans les mitochondries Codé par <i>SOD2</i> CuZn SOD Localisé dans le cytoplasme Codé par <i>SOD1</i>	Impliqué dans la transformation des anions superoxydes. $O_2^- \rightarrow O_2 + H_2O_2$
La voie enzymatique des Pentoses phosphates -6-phosphate déhydrogénase (Codé par <i>ZWF1</i>) -Transkétole (Codé par <i>TKL1</i>) -5-phosphate épimérase (Codé par <i>RPE1</i>)	Enzymes nécessaires à la production du NADPH, essentiel pour la réduction d'enzymes antioxydantes tels : Glutathione réductase et thiorédoxine réductase.
Glutathione réductase (Codé par <i>GLR1</i>)	Impliquée dans le maintien d'un bon statu réduct-oxydé dans la cellule, réduction de la glutathione. (GSH=GssG _{réduite})
Glutathione peroxydase	Utilise la glutathione comme donneur d'électrons pour réduire le hydroxyperoxyde et le H ₂ O ₂
Thiorédoxine réductase Thiorédoxine peroxydase	Agissent de pair avec la thiorédoxine et le NADPH pour réduire le alkyl hydroxyperoxyde et le peroxyde.
Endonucléase Apn1 Codé par <i>APN1</i>	Impliqué dans la réparation des dommages causés à l'ADN. Site A/P.

Informations recueillies dans (Jamieson., 1998)

1.3.2 Détection de stress oxydant et mécanismes de régulation génétique chez *E.coli*.

Chez la bactérie *Escherichia coli*, les régulateurs de transcription OxyR et SoxR sont impliqués dans la réponse au stress oxydant (Demple et al., 1991). OxyR est activé par la formation de liens dissulfures entre ces cystéines 199 et 208.



Ces liens occasionnent présumément un changement dans la conformation de la protéine ce qui accentuerait la liaison à l'ADN et l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la réponse aux stress oxydant (Zeng et al. , 1998) tels : la catalase, la thiorédoxine peroxydase, etc. (Prieto-Alamo et al., 2000). Un deuxième facteur de transcription appelé SoxR/S réagit au stress oxydant en formant un homodimère contenant deux centres fer-souffre [2Fe-2S] actifs réducteurs qui sont sensibles aux O₂^{·-}. L'activation de SoxR mène à l'activation d'enzymes de détoxification (Zeng et al. , 1998) tel la superoxyde dismutase qui produit du H₂O₂. Le H₂O₂, un autre oxydant, active ensuite OxyR et la détoxification se poursuit comme décrit à la figure 1A. SoxR/S est aussi impliqué dans la production de NADPH nécessaire aux enzymes de détoxification régulées par OxyR (figure 1A et 1B).

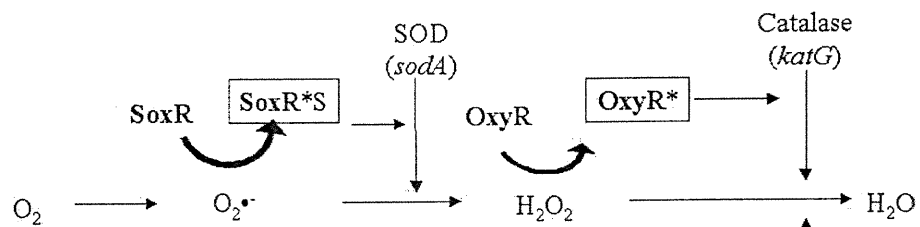


Figure 1A

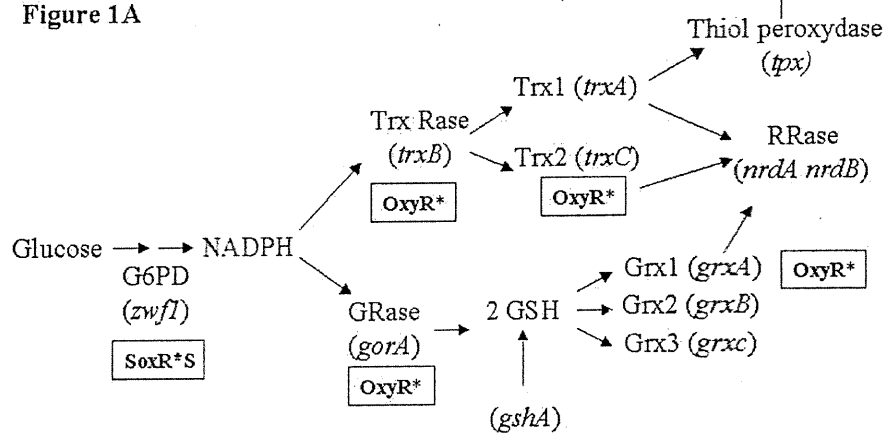


Figure 1B

Figure 1A et B : Régulation enzymatique par OxyR et SoxR/S chez *E. coli* en réponse au stress oxydant.

Les * signifie la forme oxydée des activateurs de transcription. La figure est inspirée de (Prieto-Alamo et al., 2000).

1.3.3 Détection de stress oxydant et mécanismes de régulation génétique chez *S.cerevisiae*.

En ce qui concerne la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou les eucaryotes, la régulation de l'expression génétique en réponse au stress oxydant est plus complexe qu'observée chez les procaryotes (Jamieson., 1998). De plus, on peut observer plusieurs boucles de rétroaction entre les réponses aux stress oxydants et celles face à d'autres stress tels : les chocs thermiques, osmotiques, ioniques etc. Plusieurs activateurs de transcription répondants aux stress oxydants ont été identifiés chez *S.cerevisiae*.

1.3.3.1 Facteurs de transcription reliés au stress oxydant chez *S.cerevisiae*.

Les facteurs de transcription de la levure sont classés selon des familles ayant des caractéristiques distinctes. On retrouve en premier lieu, des facteurs de transcription liants le cuivre tel Ace. Ace possède un domaine riche en cystéines (liant le cuivre) et un domaine de liaison à l'ADN. Ace est impliqué dans le maintien de l'homéostasie du cuivre et régule l'expression de la protéine antioxydante métallothionéine. Il a aussi été démontré *in vitro* que Ace peut lier le promoteur de *SOD1* activant la superoxyde dismutase (Gralla et al., 1991). La protéine Mac-1 quant à elle, est impliquée dans la réduction des ions ferreux et cuivreux et active le gène *CTTI* (catalase).

Il existe aussi des facteurs de transcriptions en doigts de zinc tel Hap1 qui régule l'expression d'isoformes du cytochrome C, de la catalase et de la superoxyde dismutase mitochondriale. Msn2 et Msn4 sont aussi deux protéines en doigts de zinc impliqués quant à elle dans la réponse dépendante de l'élément répondant aux stress Stre (stress responding element) (Martinez-Pastor et al., 1996). La dernière famille est appelée b-zip et vous sera présenté à la section 1.3.4. Il existe d'autres facteurs de transcription impliqués dans l'activation de la transcription en réponse au stress oxydant tels : Skn7, Gcn4, Imp2, cependant, seul Xbp1 agit comme répresseur en se

liant à l'ADN d'autres activateurs face à un stress oxydant. Xbp est aussi régulé par plusieurs autres facteurs de stress (Marchler et al., 1993, Jamieson., 1998).

1.3.4 Yap1 de *Saccharomyces cerevisiae* est un activateur de transcription membre de la famille b-Zip.

Un des activateurs de transcription impliqués dans la réponse au stress oxydant les mieux caractérisés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, est le gène *YAP1*. Il s'agit d'un activateur de transcription de la famille des b-Zip " leucine-zipper" similaire à ceux rencontrés chez la famille C-Jun des cellules de mammifère. Yap1p possède un domaine de dimérisation de type "Leucine-zipper" qui est adjacent à la région basique (B-Zip) d'interaction avec l'ADN (figure 2). La région d'ADN reconnue par Yap1p se nomme ARE pour AP-1 response element TGACTCA (Karin et al., 1997). La famille YAP comprend 8 membres chez *S.cerevisiae* ; Yap 1 à 8. Ces protéines contiennent aussi deux domaines riches en cystéines ; le domaine amino-terminal et le domaine carboxy-terminal (Yan et al 1998) qui contient aussi le signal d'exportation nucléaire (NES) L(X)₂₋₃L(X)₂₋₃LXL (Bogerd et al., 1996).

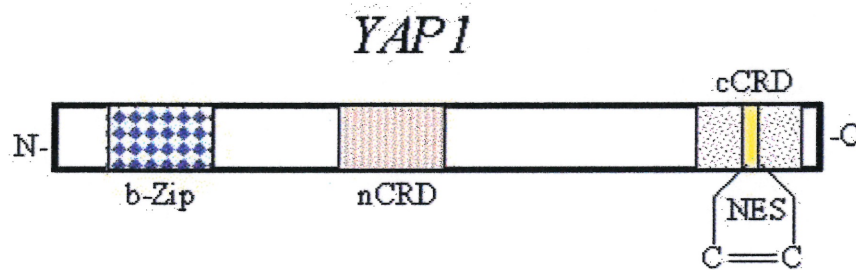


Figure2 : Représentation schématique du gène *YAP1* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Les X représentent un acide aminé quelconque. La figure est inspirée de (Jones et al., 2001).

Yap1p est reconnu pour son implication dans la résistance cellulaire de *S.cerevisiae* au stress oxydant et à une grande variété d'agents cytotoxiques tels : la cycloximide, le sulfométuron, le 4-nitroquinoline etc (Jones et al., 1999). Ces phénotypes peuvent s'expliquer par le fait que Yap1p contrôle 3 membres des transporteurs ABC (ATP-binding-cassette) : *YCF1*, *SNQ2*, *PDR5* (Wemmie et al., 1994, Miyahara et al., 1996) qui sont connus pour le transport (énergie-dépendant (ATP)) de substances à travers la membrane cellulaire. Yap1p induit aussi deux protéines de la famille MF (Major Facilitator) : Atr1 et Flr1 qui est une pompe (Alarco et al., 1997, Coleman et al., 1997). Yap1p interagit aussi avec *PDR1* et *PDR3* (Pleiotropic Drug Resistance) deux activateurs de transcription répondant à différents agents (Wendler et al., 1997). Une étude démontre aussi que la protéine Yap1p peut se lier à une séquence autre que le ARE ; le STRE, lorsque stimulée par un stress thermique (Gounalaki et al., 1994).

Plusieurs autres gènes sont contrôlés par Yap1p et certains d'entre eux sont impliqués dans la réponse au stress oxydant. On retrouve dans cette catégorie, *GLR1*, *TWF*, *SOD1*, *GSH1*, *TRX2*, *SNK7* (Jamieson et al., 1998).

1.3.4.1 Régulation de YAPI en réponse au stress oxydant

La régulation du gène *YAPI* de la levure *Saccharomyces cerevisiae* face au stress est assez bien caractérisée. Dans un modèle semblable à l'activation de l'activateur de transcription *OXYR* de *E.coli*, la régulation de Yap1p se fait par la formation de liens dissulfures entre deux cystéines conservées C598 et C620 (Yan et al., 1998). En absence de stress, Yap1p se retrouve autant dans le noyau que dans le cytoplasme de la cellule. Le domaine C-terminal (cCRD) riche en cystéines permet l'exposition du NES qui lie le transporteur Crm1 permettant l'exportation de Yap1p hors du noyau. Lors qu'il y a une situation de stress oxydant (H_2O_2), il y a la formation de ponts dissulfures entre les cystéines de Yap1p. Ces ponts changent la conformation de la protéine et le NES n'est plus accessible pour Crm1. Comme la liaison de Yap1p avec son exporteur n'est plus, Yap1 est donc séquestré dans le

noyau afin d'activer la transcription de gènes en réponse au stress oxydant (Kuge et al., 1998). La séquestration nucléaire de Yap1p s'observe aussi lorsqu'il y a inactivation de la thiorédoxine, de la thiorédoxine réductase ou de la thiorédoxine peroxydase. Ceci suggère que Yap1p, en plus d'être un senseur du niveau rédox de la cellule, peut aussi être régulé par une boucle de rétroaction engendrée par d'autres molécules ou enzymes réductrices de la cellule (Kuge et Jones., 1994) comme démontré à la figure 3.

En terminant, il est important de mentionner que Dumond et al. (2000) ont démontré que *YAPI* peut activer certains gènes en réponse au H_2O_2 dont des gènes codants pour des chaperonnes, des protéines impliquées dans la réponse spécifique au stress oxydant, des protéines du métabolisme cellulaire et de la dégradation protéique. Ce groupe a aussi démontré que *YAPI* contrôle négativement l'expression de gènes codants pour la biosynthèse de nucléotides et inositols en absence de stress. Finalement, aussi en absence de stress, *YAPI* contrôle l'expression de gènes codants pour des protéines impliquées dans la structure de la paroi cellulaire et dans le trafic intracellulaire dont : *OCHI*, *ERV25* et *GASI* (Dumond et al., 2000) .

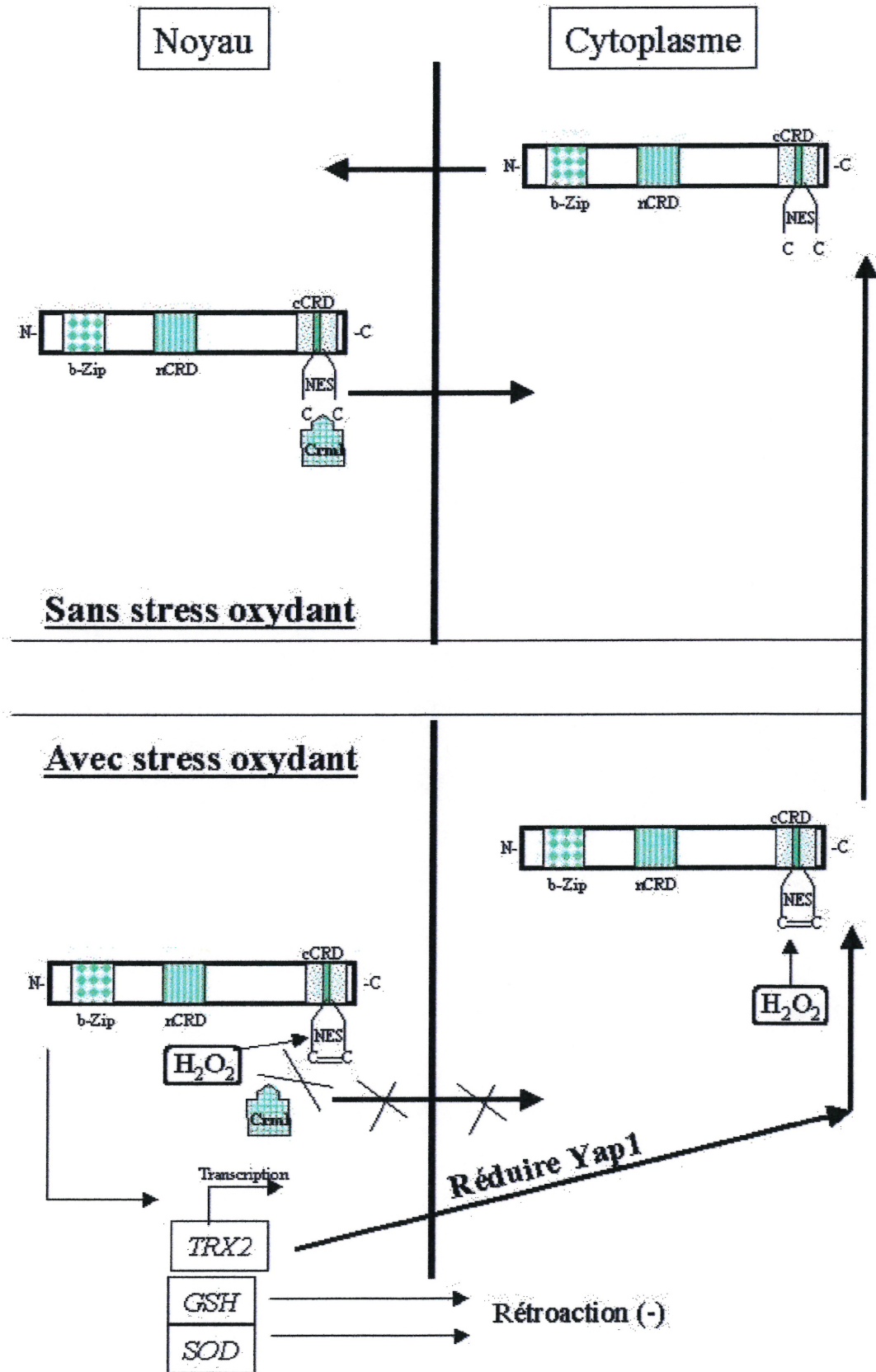


Figure3 : Schéma de la régulation de YAP1 lors de stress oxydant.
 La figure est inspirée de (Jones et al., 1999, Kudo et al., 1999).

1.3.5 Les facteurs de transcription de cellules de mammifères et leur régulation lors de stress oxydant.

Comme chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, en plus de la respiration cellulaire, chez les mammifères, plusieurs cytokines, facteurs de croissance et éléments de la réponse immunitaire peuvent produire beaucoup de dor. De plus, comme chez la levure et la bactérie, chez les cellules de mammifère, la régulation des facteurs de transcription garde une bonne homologie à ces organismes inférieurs.

La régulation des facteurs de transcription Tels : NF1 (Bandyopadhyay et al., 1994), Sp-1 (Wu et al., 1996), c-Myb (Myrset et al., 1993), p53 (Rainwater et al., 1995), Erg-1 (Huang et Adamson, 1993) et NF- κ B (Schreck et al., 1992) chez les cellules de mammifères s'effectue de façon homologue à la levure *Saccharomyces cerevisiae* par une liaison à l'ADN dépendante du statu rédox de la cellule (Toone et al., 2001). En effet, cette régulation semble dépendre dans la plupart des cas de la présence de résidus cystéines critiques.

Les AP-1 de mammifère sont formés d'homo et d'hétérodimères de protéines de la famille Jun, Fos ou ATF. L'activité de liaison à l'ADN des AP-1 de mammifère est affectée par l'oxydation réversible de résidus cystéines spécifiques situés dans le domaine de liaison à l'ADN de protéines Fos et Jun. La réduction de ces cystéines stimule la liaison à l'ADN *in vitro* de même que lors d'une stimulation par différents oxydants. En effet, on pense que *in vivo*, en réponse à certains stimuli incluant le stress oxydant, la thiorédoxine serait transloquée au noyau facilitant ainsi son interaction avec Ref-1 (AP-endonucléase) et Ref-1 réduirait la cystéine critique du facteur de transcription AP-1 (Hirota et al., 1997).

Certains autres facteurs de transcription Ap-1 de mammifère sont régulés comme Pap1 de *S.pombe*, par la voie d'une Map Kinase sensible au statu rédox de la cellule. L'activation de la transcription de la protéine c-Jun est fortement augmentée par la phosphorylation de deux résidus sérines dans son domaine d'activation N-terminal (Tibbles et Woodgett, 1999). c-Jun kinase et p38 constituent les deux familles majeures de map kinases activées par un stress, pouvant être activé par différents stress tels : choc osmotique, choc thermique, dommages causés à l'ADN.

Cependant, la façon dont le statu rédox de la cellule active la map Kinase n'est pas encore connue (Toones et Jones, 2001).

1.4 La bléomycine

En plus des sources endogènes de dérivés oxygénés réactifs qui peuvent provoquer une situation de stress oxydant dans la cellule, certains agents xénobiotiques utilisés en médecine provoquent aussi cette situation de stress oxydant dans la cellule. Un bon exemple d'agents xénobiotiques causant un stress oxydant est la bléomycine.

1.4.1 La bléomycine, un agent oxydant et ses caractéristiques

La bléomycine est un antibiotique hydrosoluble découvert en 1966 par le groupe de Umezawa et al. (1966). Cet agent se retrouve sous la forme de 11 isomères qui diffèrent les uns des autres par la partie amine terminale et la forme la plus abondante est la bléomycine A₂. La bléomycine a été isolée en complexe cuivreux d'un milieu de culture de *Streptomyces verticillis* (Umezawa et al., 1966) et il a été démontré que cette molécule peut lier directement l'ADN (Burger et al., 1981). En tant que mutagène de l'ADN, la bléomycine (BLM) est utilisée comme agent thérapeutique sous forme de mélange appelé Blénoxane, qui contient 60% de BLM A₂, 30% de BLM B₂ et 10% d'autres isomères (Burger et al., 1994). Son utilisation comme agent antitumoral se fait principalement contre des cancers du cou, de la tête, du poumon et des testicules. Une propriété importante de la bléomycine qui justifie son utilisation en médecine, malgré qu'elle doive être combinée à d'autres agents antinéoplasique, est qu'elle ne semble pas causer de myélosuppression (Lanzo et al., 1996). De plus, son élimination systémique se fait rapidement par le rein (la moitié est éliminée en 2 à 4 heures). Cependant, à trop forte dose, la BLM (~235mg) peut causer une fibrose pulmonaire (Lazo et al., 1987).

1.4.1.1 La structure de la bléomycine

La figure 4 nous représente schématiquement la structure de la bléomycine. La BLM comprend 3 domaines fonctionnels : le domaine de liaison aux métaux en partie N-terminale, le domaine de liaison à l'ADN en C-terminal et la partie carbohydrate.

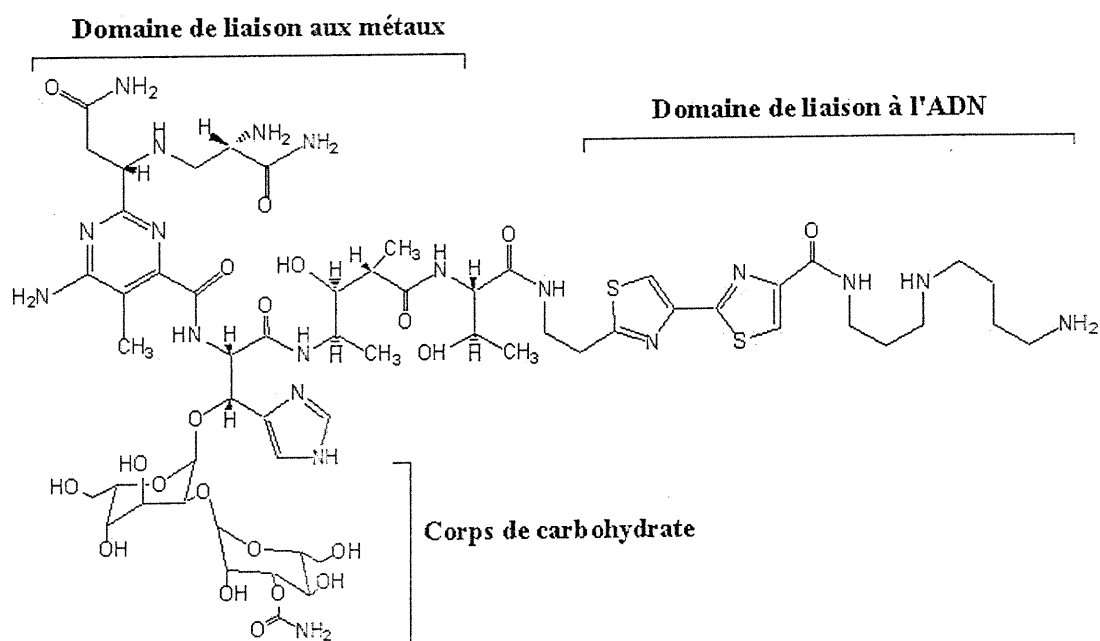


Figure4 : Schéma de la structure de la bléomycine

La figure est inspirée de (Ramotar et al., non publié).

1.4.1.2 Mécanisme d'action de la bléomycine et les dommages causés aux sucres et aux bases.

Pour être efficace, la bléomycine doit être activée. Cette activation se fait grâce à sa capacité de lier simultanément l'oxygène et les métaux de transition tels : Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} et/ou Cu^{2+} . Les ions facilitent le contact entre la bléomycine et l'ADN et réagissent avec l' O_2 pour former des dérivés oxygénés réactifs. Le cobalt est l'ion qui forme le complexe le plus stable avec la BLM, cependant, cliniquement, on retrouve surtout la BLM complexée avec le fer (Sausville et al., 1978). La régénération du FeII permet à une seule molécule de BLM de briser de 8 à 10 brins d'ADN (Mir et al., 1996) selon la réaction décrite à la figure 5.

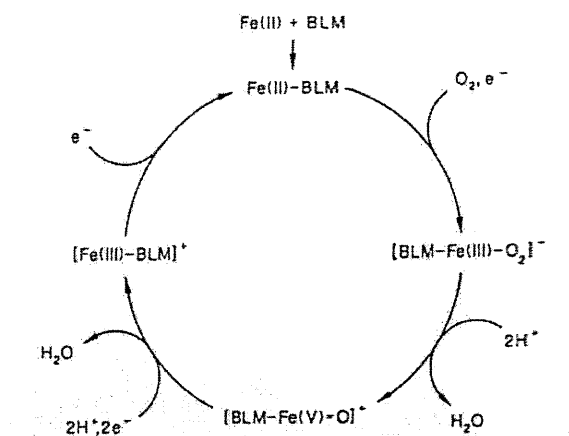


Figure5 : Mécanisme possible d'activation de la bléomycine (régénération du fer)

La figure est inspirée de (Hecht S. M., 2000).

La bléomycine activée (BLM-Fe(II)-O₂) agit comme oxydant, elle enlève un atome d'hydrogène du carbone 4' du déoxyribose pour produire un sucre (carbon-radical) et un électron qui réduit la forme active de la BLM (BLM-Fe(III)-OH•) qui attaque de multiple fois l'ADN (Burger et al., 1981). Le sucre instable restant est ainsi réarrangé et peut former 4 types de dommages. Comme premier dommage, on peut mentionner les sites AP (abasiques ; perte d'une base entière)(Kozarich et al., 1993), puis les bris à l'ADN simple brin (où la partie 3' se termine par une portion du cercle déoxyribose 3' phosphoglycolate (3'PG)) qui bloque la synthèse d'ADN (Kozarich et al., 1993). Ensuite, lorsque la partie malondialdéhyde de la base réagit avec la guanine, il se forme la pyrimidopurine de déoxyguanosine (M₁G) qui peut être aussi causée par le métabolisme aérobie (Marnett et al., 1998). Finalement, il peut résulter des bris double-brins de l'ADN, sur certaines séquences précises CGCC, lorsque le complexe Fe/BLM cause un site AP sur un brin et un bris simple brin sur le brin directement opposé.

1.4.1.3 La bléomycine peut aussi endommager l'ARN.

Il a été démontré *in vitro* que la bléomycine pouvait aussi avoir comme cible l'ARN. En effet, la BLM peut couper différents types d'ARN dont l'ARN messager de la reverse transcriptase de Hiv-1, son ARN de transfert, ribosomale et même l'ARN présent en hétérodimère ARN/ADN (Carter et al., 1990). L'incision dans l'ARN est produite par une voie oxydante résultant du mécanisme de clivage de l'ADN (Holmes et al., 1997). De plus, la coupure se fait préférentiellement aux séquences 5'-GU-3' retrouvées aussi dans l'ADN (Carter et al., 1990). Il est postulé que l'ARN ne soit coupée par la BLM que selon sa structure puisque certains ARN (*E.coli* ARN^{TYR} et ARN^{ASP} de mitochondries de levure) (Carter et al., 1990) ne sont pas affectés par la BLM. De plus, l'ARN double brins n'est pas coupé par la BLM (Holmes et al., 1997). En dernier lieu, la réaction BLM/ARN est inhibée par le magnésium (Carter et al., 1990). Puisque le Mg²⁺ est requis pour le maintien de la structure/fonction de plusieurs ARNs, il est justifiable de penser que les altérations

causées à l'ARN par la bléomycine ne seraient dues qu'à une similitude de conformation avec l'ADN et donc, il serait peu probable que l'ARN soit la cible thérapeutique de la bléomycine (Mascharak et al., 1992).

1.4.1.4 Dommages causés à la paroi cellulaire par la bléomycine.

La bléomycine, en plus de couper l'ADN et l'ARN, endommage aussi la paroi cellulaire. En effet, à de forte dose prolongée de bléomycine, de petits trous sont formés à la surface de la paroi exposant le protoplaste qui, subissant un choc osmotique, risque de mener à la rupture de la membrane plasmique et à la mort cellulaire (Lipke et al., 1993). Les bris de la paroi semblent être dus à une coupure des liens glycosyliques des polysaccharides à un site s'apparentant à celui où coupe la bléomycine sur la partie déoxyribose de l'ADN (Lipke et al., 1993). De plus, la membrane plasmique est susceptible de subir un dommage oxydant ; la peroxydation des lipides, ce qui pourrait être l'initiation de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Arndt et al., 2001).

1.4.2 Internalisation de la bléomycine.

La bléomycine est reconnue pour passer difficilement la membrane plasmique de la cellule (poddevin et al., 1991) laissant voir une limite possible à la cytotoxicité de la bléomycine. Cependant, il a été démontré que la BLM pourrait lier la membrane plasmique (hamster chinois) jusque sur 400 000 sites (Pron et al. 1993) ce qui laisse supposer que la BLM pourrait être internalisée spécifiquement. Les recherches sur le mode de transport de la bléomycine sont assez sommaires jusqu'à maintenant cependant, il est démontré dans un article à l'aide de la BLM marquée radioactivement, qu'une protéine de la membrane de 250 kDa pourrait de par son activité être responsable du transport spécifique de la BLM (Pron et al., 1993).

L'identité et la fonction précise de cette protéine n'ont jusqu'à présent pas encore été confirmées.

1.4.3 La résistance à la bléomycine

La propriété de liaison à l'ADN de la bléomycine et sa mutagénicité suggèrent que les cellules doivent avoir développées plusieurs mécanismes de défense contre cet agent. En effet, dans la littérature, on nous indique que plusieurs éléments cellulaires sont impliqués dans la défense contre la bléomycine tels : la paroi cellulaire, la membrane plasmique, des protéines de liaison (séquestration de la BLM), des protéines de réparation des dommages à l'ADN (Pron et al., 1993, Lipke et al., 1993 et Ramotar et al., 1997). Ainsi, on peut voir dans le tableau IV que la cellule utilise certaines protéines pouvant lier irréversiblement la BLM pour se protéger contre celle-ci (Gatignol et al., 1988).

Tableau IV : Protéines liant la bléomycine (défense et/ou résistance cellulaire à la BLM ?)

Protéines	Fonction	Référence
Sh ble	Peut lier la bléomycine et peut lier l'ADN et la protéger contre la BLM.	(Gatignol et al., 1988)
ble (relié à <i>S. verticillis</i>)	Liaison de la bléomycine pour une séquestration possible et/ou une meilleure exportation.	(Calcutt et al., 1994)
Acétyl transférase Codé par <i>BLMB</i>	Acétylation de l'amine primaire de la BLM (inactivation)	(Sugiyama et al., 1994)
Bléomycine hydrolase	Convertir la bléomycine en déamino-BLM (inactivation) (responsable de la résistance de certaines cellules face à BLM)	(Sebti et al., 1987, Xu et Jonhston., 1994)

En plus des protéines liant la BLM, la cellule possède plusieurs enzymes de réparation de l'ADN pour contrer les dommages causés par la bléomycine lorsque les mécanismes de défense précédents n'ont pas été efficaces. Elles sont présentées dans le tableau V.

Tableau V : Protéines (enzymes) impliquées dans la réparation de l'ADN (défense et/ou résistance cellulaire à la BLM ?)

Gènes (enzymes)	Organismes	Description/fonction	Références
<i>CDC9</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ADN ligase	(Moore., 1982)
<i>RAD6</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Impliquée dans l'ubiquitination	(He et al., 1996)
<i>RAD52</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Réparation des bris double brins dans l'ADN.	(Keszenman et al., 1992)
<i>RBP7</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Une sous unité de l'ARN polymérase II	(He et Ramotar., 1999)
<i>OXA1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Protéine de la membrane mitochondriale requise pour modifier CoxII	(Masson et al., 1996)
<i>HDF1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Protéine homologue à la sous unité 70 kDa de l'autoantigène Ku humain. (régulation de l'ADN protéine kinase) (réparation, réplication, recombinaison)	(Mages et al., 1996)
<i>IMP2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Co) activateur de transcription	(Masson et al., 1996)
Exo III	<i>Escherichia coli.</i>	Exonucléase (réparation des sites AP)	(Masson., 1997)
Endo IV	<i>Escherichia coli.</i>	Endonucléase (réparation des sites AP)	

Le premier homologue des enzymes EndoIV et ExoIII de *E.Coli* à être identifié chez les eucaryotes (*S.cerevisiae*) est Apn1 (Ramotar et al., 1991). Cependant, bien que chez *E.coli* les mutants défectifs en EndoIV ou ExoIII démontrent une certaine sensibilité à la BLM, un mutant délété en *apn1Δ* chez *S.cerevisiae* n'est pas sensible à la BLM suggérant que la levure aurait développé d'autres mécanismes de réparation/résistance compensatoire (Zheng et al., 1998). Un article récent nous démontre cependant que la délétion double *apn1Δapn2Δ* chez la levure rend celle-ci hypersensible à la BLM (Vance et al., 2001). Ces résultats suggèrent un phénomène de compétition entre ces deux protéines pour réparer les dommages causés à l'ADN par la BLM.

1.5 Le gène *IMP2* de *Saccharomyces cerevisiae* ; un activateur de transcription impliqué dans la résistance cellulaire à la bléomycine et à d'autres agents oxydants.

La recherche de gènes impliqués dans la résistance de *S.cerevisiae* à la bléomycine a mené à la découverte principalement d'enzyme de réparation de l'ADN. Cependant, il existe plusieurs autres gènes dont la fonction demeure encore inconnue (Moore., 1991). Afin de mieux caractériser comment la cellule peut se défendre contre les lésions causées à l'ADN par la bléomycine, le docteur Ramotar et son équipe ont isolé un mutant de *S.cerevisiae* hypersensible à la bléomycine et différents des autres gènes préalablement identifiés : le mutant est inactivé dans un gène appelé *IMP2* (Ramotar et Masson., 1996).

1.5.1 *IMP2* pour "Independent of Mitochondrial Particle"

Le gène *IMP2* a d'abord été identifié en 1992 par l'équipe de Donnini et nommé ainsi pour "Independent of Mitochondrial Particle". En effet, le gène *IMP2* est impliqué dans le métabolisme du galactose, du maltose et du raffinose ; il permet la croissance

cellulaire en présence de ces sucres lors d'une défaillance mitochondriale (inactivation à l'érythromycine) (Donnini et al., 1992). Imp2 serait responsable de la transcription afin d'activer les gènes codants pour les enzymes, maltase, maltose perméase et la galactose perméase, en absence de glucose (Lodi et al., 1995). Il y a bien d'autres phénotypes imputés à une délétion du gène *IMP2* chez *S.cerevisiae* dont une faible croissance sur des milieux respiratoires et une sensibilité accrue aux chocs thermiques, aussi, la sporulation est altérée (Donnini et al., 1992).

1.5.2 IMP2 est impliqué dans la résistance aux agents oxydants.

En plus de la sensibilité impressionnante d'un mutant *imp2Δ* de *S.cerevisiae* face à la bléomycine découverte en 1996 par Ramotar et al, des phénotypes de sensibilité à plusieurs autres agents ont été recensés par cette équipe. En effet, un mutant *Imp2Δ* est aussi sensible à plusieurs agents oxydants tels : le peroxyde d'hydrogène, le ter-butyl hydroxyperoxyde, le paraquat, le diamide, et la ménadione. Ce mutant n'est cependant pas sensible aux agents endommageants l'ADN tels que : les rayons U.V.(254nm), le MMS, le 4-NQO et les radiations ionisantes. Il a aussi été démontré qu'un mutant délété en *Imp2Δ* éprouve de la difficulté à réparer l'ADN (accumulation de bris d'ADN simple-brin) (Ramotar et Masson., 1996).

1.5.3 IMP2 est impliqué dans le maintien de l'homéostasie ionique

Il a été démontré que *IMP2* est impliqué dans le maintien de l'homéostasie ionique. En effet, un mutant délété en *imp2Δ* est sensible aux ions monovalents Li^+ , Na^+ et divalents : Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} ; une accumulation de ces ions ayant été observé chez un mutant délété en *imp2Δ* (Ramotar et Masson., 1998). La surexpression du gène *ENA1* codant pour une pompe ionique ou du gène *HAL3* ; un inhibiteur de la phosphatase Ppz1 arrivent à reconferer une résistance ionique à un

mutant *imp2Δ* (Nadal et al., 1998). La sensibilité ionique accrue du double mutant *ena1Δ imp2Δ* en comparaison avec chacun des simples mutants indique que *IMP2* et *ENAI* seraient impliqués dans deux voies de signalisation différentes (Ramotar et Masson., 1998). Puisque la surexpression de *ENAI* ou de *HAL3* reconferme la résistance ionique à un mutant délété en *imp2Δ*, mais est incapable de reconfermer la résistance aux oxydants, il est suggéré que *IMP2* pourrait réguler plusieurs gènes en réponse à différents stress.

1.5.4 La structure et les propriétés fonctionnelles de *IMP2*.

Imp2p est une petite protéine de 37 kDa qui peut activer la transcription d'un gène rapporteur en vertu de son domaine acide (caractéristique de plusieurs activateurs de transcription) (Ramotar et Masson 1996). De plus, Lodi et al. ont démontré en 1995 que *IMP2* régule positivement les gènes *MALS* et *MALT* impliqués dans l'utilisation du maltose.

Ainsi, malgré qu'il ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN, *Imp2* serait un activateur (co activateur) de transcription. Les mécanismes par lesquels *Imp2* détecte les différents stress ne sont pas encore élucidés, de même que ces cibles transcriptionnelles ou son mode d'action. *IMP2* n'influence cependant pas l'expression de Rad6 ou de Rad52 ni aucunes autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Ramotar et Masson 1996B). Il est aussi peu probable que *IMP2* régule la transcription d'une pompe connue pour éliminer la BLM, puisqu'un mutant *imp2Δ* est aussi hypersensible au H₂O₂ qui diffuse librement dans la cellule. De plus, il a aussi été démontré chez *S.cerevisiae*, que les pompes Snq2, Atr1, Fir1 et Yor1, ne sont pas impliquées dans la résistance à la bléomycine (Alarco et al., 1997).

Dans un deuxième ordre d'idée, il est important de mentionner que la sensibilité d'un mutant *imp2Δ* à la BLM ou au H₂O₂ ne proviens pas d'une défaillance d'une fonction antioxydante. En effet, le double mutant *trx2Δ gsh1Δ* n'est pas sensible ni à la BLM, ni au H₂O₂. De plus, un mutant défaillant en la

superoxyde dismutase ou en la catalase T ne sont pas sensible à la BLM (Ramotar et Masson 1996B).

Il est cependant possible d'émettre des hypothèses quant au mode d'action possible de *IMP2*. En effet, la protéine Imp2 possède un domaine (R/S) riche en arginines/sérines, un domaine connu chez d'autres protéines pour être impliqué dans la phosphorylation de la protéine. Ce qui laisse croire que Imp2 pourrait subir des modifications post-traductionnelles en réponse aux stress (Rossi et al., 1996). De plus, Imp2 possède un domaine (LRR) riche en leucines qui comme vue chez d'autres protéines, peut être responsable d'une interaction protéine/protéine (ex : Ccr4) (Benson et al., 1998). Aussi, l'interaction protéine/protéine de Imp2 (qui ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN) permettrait l'activation de la transcription. Un modèle de la structure de la protéine Imp2 est présenté à la figure 6.

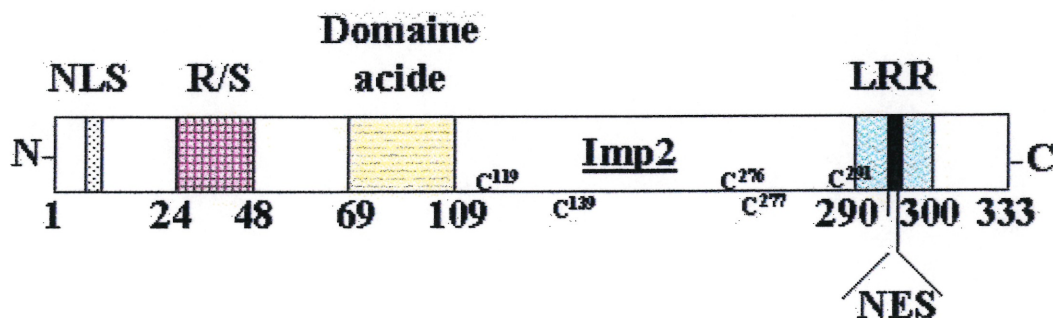


Figure 6 : Schéma de la structure de la protéine Imp2

La figure est inspirée de (Ramotar et Masson., 1996).

Jusqu'à présent, aucune cible transcriptionnelle de Imp2 n'a encore été identifiées et une seule protéine semble interagir avec Imp2 selon Pimplikar et al., 1998 ; il s'agit de la protéine Pat1. Pat1 est une protéine interagissant avec les microtubules et est responsable dans l'organisation des protéines de la paroi cellulaire.

1.6 La paroi cellulaire

La paroi cellulaire est une structure très complexe (Mrsa et al., 1998). La paroi de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est organisée en deux feuillets, composés de seulement 4 macromolécules : les protéines de la paroi, les β 1,3-glucans, les β 1,6-glucans et la chitine qui interagissent de façon covalente (Klis et al., 1999). Le tableau VI décrit les types de liaisons connues entre les macromolécules de la paroi cellulaire.

1.6.1 Les protéines de la paroi cellulaire

Les protéines de la paroi cellulaire sont aussi appelées Mannoprotéines et sont de polypeptides fortement glycosylés et généralement formés de glycanes liés à leur partie N-terminale et dont le corps a la structure suivante : $\text{Man}_{10-14}\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ (Lipke et al., 1998). Ces protéines peuvent être divisées en trois groupes (Mrsa et al., 1999).

Le premier contiens des protéines (majoritairement enzymatique) attachées soit par des liens dissulfures ou non-covalement liées aux composantes structurales de la paroi (elles sont sensibles au SDS) (Valentin et al., 1984).

Le deuxième groupe comprends des protéines qui contiennent des signaux d'ancrage GPI à leur partie C-terminale et sont présumément liées aux β 1,6-glucans par cet ancrage GPI restant après le transfert des protéines de la membrane plasmique à la paroi cellulaire (ex : Gas1), leur rôle est inconnu (Mrsa et al., 1999).

Le troisième groupe comprends des protéines qui sont liées de façon covalente aux composantes structurales de la paroi. Les protéines de ce groupe identifiées jusqu'à présent semblent être de la même famille que Ccwp (Covalently bound cell wall protein) dont une, Ccw11p est identique à Ccw5p qui contiens des séquences répétitives à sa partie N-terminale et appelée Pir1 (Mrsa et al., 1999).

1.6.2 Les β -Glucans.

Un deuxième type de macromolécules de la paroi cellulaire forme un réseau fibreux amorphe et se nomme β -Glucan. Il y a les β 1,3-glucans, localisés à la membrane plasmique et liés à la chitine, puis les β 1,6-glucans (possiblement retrouvés en périphérie) qui sont très ramifiés et lient entre elles, les autres macromolécules. La plupart des β 1,3-glucan ont une conformation hélicoïdale composée d'une chaîne de polysaccharides et de trois autres chaînes liées par des liens hydrogènes. L'enzyme β 1,3-glucan synthase est aussi localisée à la membrane plasmique (Lipke et al., 1998).

1.6.3 La chitine

Le dernier groupe de macromolécules contient la chitine. La chitine est liée glycosyliquement aux ramifications non-réductrices des glucans (β 1,3 et β 1,6). Elle forme différents modules qui s'associent pour former des microdomaines d' α -chitine cristalline. Ces microdomaines sont essentiels à l'insolubilité de la paroi et sont responsables du transfert de matériel de la fraction soluble vers la fraction insoluble de la paroi (Lipke et al., 1998).

Tableau VI : Liaisons connues entre les macromolécules de la paroi cellulaire de levure.

Liaisons de la paroi cellulaire
CWP-GPI*--- β 1,6-glucan
β 1,6-glucan--- β 1,3-glucan
Chitine--- β 1,3- glucan
Chitine--- β 1,6-glucan

* Dans le tableau VI, CWP-GPI* signifie protéine de paroi ayant un ancrage GPI.

L'architecture de la paroi cellulaire est flexible et sujette à plusieurs modifications dans sa composition et sa structure lorsque la cellule est mise en diverses situations telles : les changements causés par le cycle cellulaire et les changements environnementaux (disponibilité des nutriments et/ou de l'oxygène, les variations de pH et/ou de température) (Mrsa et al., 1999). De plus, si la paroi est défaillante (mutations, dommages, etc.), il survient des changements architecturaux dramatiques. En effet, on peut observer une augmentation du niveau de chitine chez plusieurs mutants (décrit dans le tableau VII) ayant un défaut dans la paroi cellulaire (ex : *gas1Δ*), pour compenser ce manque (Klis et al., 1999).

Tableau VII : Caractérisation phénotypique de certains mutants reliés à la paroi cellulaire de levure.

Mutants	Phénotypes connus impliquant la paroi
<i>Cwh1/mnn9</i>	Les protéines de la paroi portent des chaînes N-terminale tronquées.
<i>Pmt1/pmt2</i>	L'O-glycosylation dans les protéines de la paroi est affecté
<i>Cwh6/gpi3</i>	Défaut dans l'incorporation des protéines de la paroi
<i>kre6Δ</i>	Diminution du niveau de β1,6-glucans
<i>fks1Δ</i>	Diminution du niveau de β1,3 glucans
<i>knr4Δ</i>	Inconnu
<i>Gas1Δ</i>	Inconnu

*On peut observer une augmentation du niveau de chitine dans la plupart des mutants suggérant qu'il s'agit là d'un moyen de compensation efficace. Les références des phénotypes sont inscrites dans Klis et al., 1999.

1.7 Gas1p, une protéine impliquées dans l'organisation de la paroi cellulaire.

Malgré que son rôle n'aie pas encore été identifié, la protéine Gas1p de *Saccharomyces cerevisiae* est un exemple les mieux caractérisés des protéines de la paroi cellulaire de classe II (possédant un signal d'ancrage GPI).

1.7.1 Description de Gas1, une protéine à ancrage GPI

Gas1 est une glycoprotéine ancrée dans le feuillet externe de la membrane plasmique par un glycosylphosphatidylinositol (GPI) et ayant subit quelque modifications postraductionnelles à sa partie N-terminale (Popolo et Vai., 1999). La fusion d'une protéine rapporteuse à un signal GPI potentiel démontre en effet que le positionnement des protéines GPI sans modification est à la paroi cellulaire et non à la membrane plasmique (Kitada et al., 1998). Gas1p subit trois types de modifications postraductionnelles durant sa maturation dans la voie sécrétrice. Elle est glycosylée en N-terminal, très o-mannosylée et reçoit son ancre GPI lorsque la chaîne de polypeptides est complète. De plus, son transport de réticulum endoplasmique au golgi est dépendant de l'ancre glycosidique et de la protéine Emp24; une protéine transmembranaire qui sélectionne les protéines à être excrétées. La bonne localisation de Gas1p à la membrane plasmique est essentielle à sa fonction (Nuoffer et al., 1991).

1.7.2 Fonctions de la protéine Gas1p.

La fonction exacte de Gas1p n'est pas encore clairement établie, mais il a été proposé que Gas1 agirait comme assembleur des β 1,3-glucan. Un mutant *gas1 Δ* résulte en plusieurs défauts morphogénétiques : les cellules deviennent plus larges, la division cellulaire est altérée et il se produit un arrête du cycle cellulaire. De plus, il y a formation d'un plus grand nombre de liens chitine/ β 1,6 glucan au détriment de la liaison β 1,3-glucan ce qui provoque un phénotype de résistance à la Zymolyase et une sensibilité au calcofluor white (un agent perturbant la paroi cellulaire) (Popolo et al., 1993 et 1997).

1.7.3 La famille des protéines Gas

Gas1 est une protéine faisant partie de la famille Gas. Les membres de cette famille possèdent différents domaines et sont homologues aux protéines E13B de *Triticum aestivum* et EA6 de *Arabidopsis thaliana* (Hird et al., 1993). Ainsi, ces protéines (GAS) sont membre de la famille des β 1,3-endoglucanase (glycosylhydrolase). Ces protéines dont Gas1 sont organisées en trois domaines selon la figure 7. La première partie, la partie amino-terminale (domaine C) est catalytique et est divisée en 6 boîtes contenant des acides aminés conservés ; boîtes I à VI. Le deuxième domaine est riche en cystéines et est appelé Cys-box. Finalement, les protéines Gas sont composées d'un segment C-terminal riche en sérines (Ser-box) (Popolo et Vai., 1999).

Protéines de la famille GAS

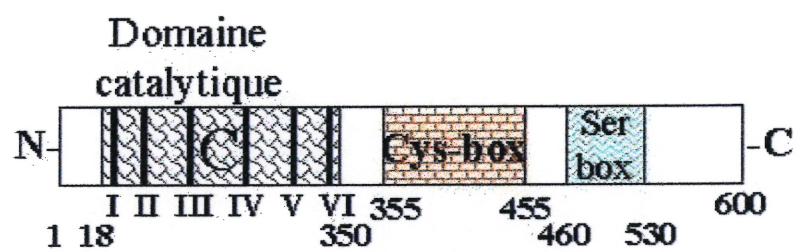


Figure7 : Schéma de la structure des protéines de la famille Gas

1.8 Problématique et objectif de ce travail

La bléomycine est un agent antitumoral utilisé dans le traitement de certains cancers tels les cancers de la tête, du poumon, du cou et des testicules. La bléomycine s'active par une liaison simultanée du fer et de l'oxygène. Lorsque activée, la bléomycine peut endommager l'ADN (liaison directe), mais aussi l'ARN et la paroi cellulaire.

L'intérêt pour cette molécule provient du fait que les cellules deviennent résistantes à la bléomycine. Le docteur Ramotar et son équipe ont isolé des mutants sensibles à la bléomycine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La caractérisation d'un mutant hypersensible à la bléomycine a mené à la découverte d'une inactivation dans le gène *IMP2*. Il s'agit d'un activateur de transcription qui est impliqué dans la réponse aux stress oxydants de même que dans le maintien de l'homéostasie ionique.

Ainsi, afin de caractériser les mécanismes de résistance cellulaire à la bléomycine, nous avons analysé dans cet ouvrage, la structure/fonction de Imp2 face à la bléomycine et à d'autres oxydants. Nous avons aussi investigué le rôle potentiel de la protéine Imp2 au niveau de la paroi cellulaire ; un des constituants cellulaires endommagés par la bléomycine.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souches de bactéries et de levures utilisées

Tableau VIII: Souches de bactéries et de levures

Organisme	Nom de la souche	Génotype
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE 44</i> <i>ΔlacU169Δ80lacZΔM15</i> <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96</i> <i>thi-1 relA1</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fy86	MAT α ; <i>his3-Δ200</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>leu2Δ</i> ; GAL2 ⁺ ;
	Dry 214	Isogénique à FY86 excepté <i>IMP22Δ::Leu2</i>
	By 4741	Mat a; <i>his3D1 leu2D0</i> <i>met15D0 ura3D0</i>
	By 4741 <i>GAS1Δ</i>	Isogénique à By 4741 excepté déléte en <i>GAS1Δ::KanMx4</i>
	By 4741 <i>IMP2Δ</i>	Isogénique à By 4741 excepté déléte en <i>IMP2Δ::LEU2</i>
	ALY-1	Isogénique à By 4741 excepté déléte en <i>GAS1Δ::KanMx4</i> et <i>IMP2Δ::LEU2</i>

2.2 Construction de plasmide

Le premier plasmide utilisé lors de cette étude a été construit par Jocelyn David *M.Sc.* Le gène encodant pour la GFP (Green Fluorescent Protein) provient du Dr Dennis J.Thiale et a été cloné en aval du promoteur GAL-1 du vecteur pYES2.0 (invitrogen), par les enzymes *KpnI/EcoRI* pour générer le plasmide **pYES-GFP**. Une protéine clonée par la suite, *EcoRI*/(enz X) se retrouve en phase et peut être visualisée grâce à cette fusion. Dr Jean-Christophe Hoflack a construit le plasmide **pYES-GFP-IMP2** en insérant le gène *IMP2* (*EcoRI/XhoI*) dans le plasmide pYES-GFP (*EcoRI/SalI*). Plusieurs autres plasmides sont analogues à ce dernier n'ayant pour seule différence, les mutations effectuées par mutagenèse dirigée (voir section 2.5) Chacuns des mutants ainsi obtenus dans pGFP-IMP2, a été sous-cloné dans un plasmide simple copie.

Ainsi,le plasmide **pYcplac22^E-595/IMP2** a été construit. Pour y arriver, la région promotrice du gène *IMP2* (595 paires de bases en amont de l'ATG) a été amplifiée en utilisant les amorces Jym-6 (*SalI*) et Jym-15 (*EcoRI*) pour être cloné dans le plasmide pBluescript.SK. (*SalI/EcoRI*). Ensuite,le gène *IMP2* muté du plasmide pGFP-IMP2 correspondant a été excisé (*EcoRI/XbaI*) afin de le cloner (*EcoRI/XbaI*) en phase dans le plasmide pBluescript-595 (contenant déjà la région promotrice du gène *IMP2*). Ainsi, le plasmide **pBluescript-595/IMP2** dont le gène *IMP2* est dissociable de son promoteur par *EcoRI* est obtenu. Pour introduire le gène complet dans le plasmide pYcplac22 tout en conservant la possibilité de ressortir le gène sans sa région promotrice, afin de le reclôner dans pYES-GFP et de faire d'autres analyses, le site *EcoRI* contenu dans le plasmide pYcplac22 a dû être éliminé en utilisant l'enzyme Klenow pour remplir le site selon le protocole établi par Gibco (feuillet accompagnant l'enzyme). Le plasmide ainsi obtenu après la ligation est **pYCPlac22^E**. Ce dernier a donc été coupé (*SalI/XbaI*) pour y insérer le gène -595/*IMP2* qui avait été excisé (*SalI/XbaI*) de pBluescript-595/*IMP2* afin de créer le plasmide **pYcplac22^E-595/IMP2**. Bien sur, les mutations effectuées sur ce dernier plasmide en font plusieurs autres homologues à ce dernier n'ayant pour seule différence, ces mêmes mutations.

Ainsi, afin d'analyser les effets des mutations déjà introduites dans le gène *IMP2* (sur le plasmide pGFP-IMP2) lorsque celles-ci se retrouvent dans un plasmide simple copie, les gènes mutés de pGFP-IMP2 correspondants ont été excisés (*EcoRI/XbaI*) pour les mettre dans pYcplac22^E-595/IMP2 (*EcoRI/XbaI*) en utilisant la portion pYcplac22^E-595 qui a été purifiée par "gene-clean" (Gibco). Le contraire a aussi été effectué pour remettre le mutant C5x (effectué dans pYcplac22^E-595/IMP2) dans pGFP-IMP2 (portion pGFP conservée), afin d'analyser la localisation cellulaire et le patron de migration de la protéine.

Afin de construire le plasmide **pYeplac195-GAS1**, le gène *GAS1* (décrit dans la section pcr) a été amplifié et coupé (*SphI/BamHI*) pour l'insérer dans pYeplac195 coupé (*SphI/BamHI*). Le plasmide utilisé pour compléter le mutant *IMP2Δ*, provient généreusement de Dr Scott Moye-Rowley (Coleman et al., 1999), pSEY18-Yap1.

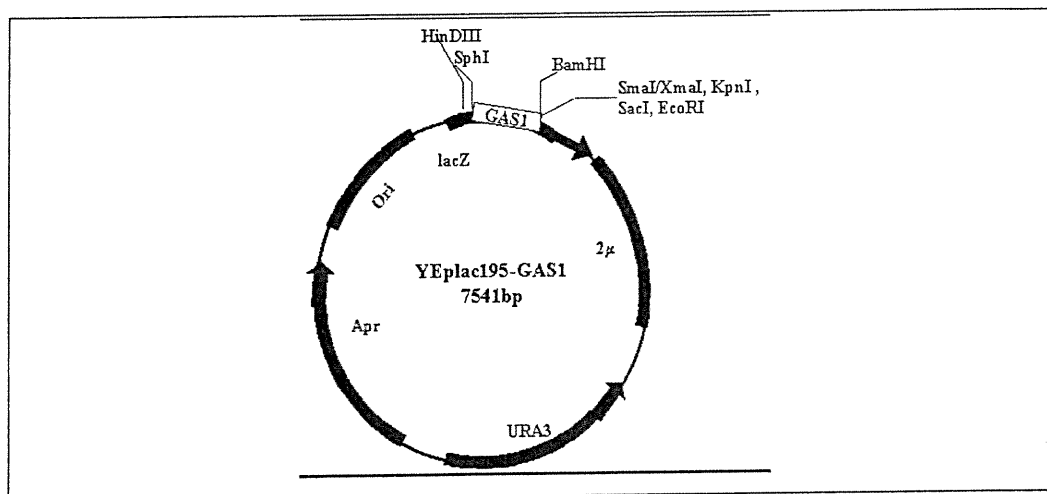
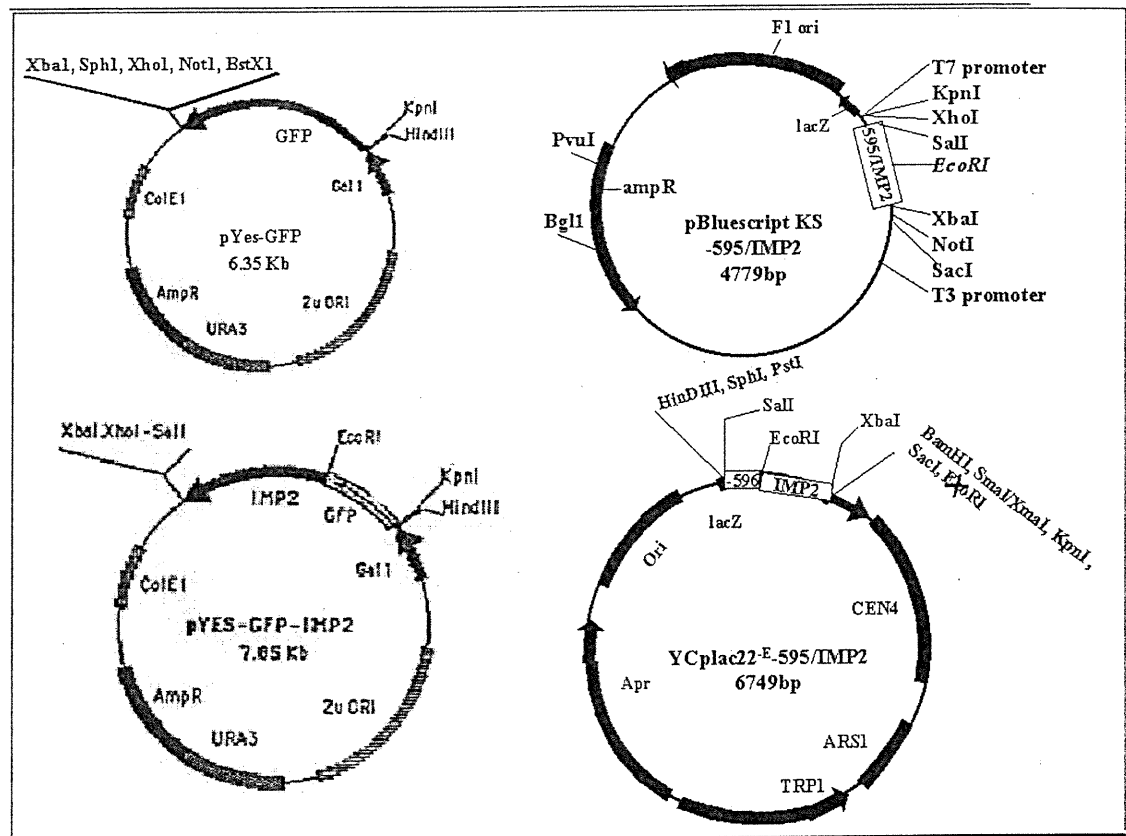


Figure8 : Schéma des plasmides utilisés dans cette étude.

2.3 Polymerase chain réaction (PCR)

En ce qui concerne les réactions PCR effectuées pour obtenir les mutations pour la mutagenèse dirigée, elles sont expliquées dans la section portant ce nom. Afin de construire le plasmide pYCplac22^{-E}-595/IMP2, la région promotrice du gène IMP2 soit, -595 paires de base en amont de l'ATG a été amplifiée en utilisant les amorces suivantes: Jym-6 (*Sall*) 5'-aagcttgg**gtcgac**gaacca-3' et Jym-15 (*EcoRI*) 5'-ccctgtggccc**cttaag**atctgctc-3'. 10µl de réaction PCR (PFU stratagene), 8µl de mixt dNTP (2.5mM chaque), 1µl d'ADN provenant du plasmide pDR1046 (généreusement donné par Dr Ramotar et contenant le gène IMP2 en entier), 0.5µl de chaque amorce, 1µl d'enzyme PFU, compléter avec de l'eau jusqu'à 100µl et ajouter 100µl d'huile pour couvrir. Le thermo-cycleur a été réglé de la façon suivante: " Hot start" 85°C pour 5min, pendant lesquelles on ajoute la PFU, 4 cycles diminuant de 1°/cycle de 95°C 1min, 1.30min à 58°C pour terminer à 54°C (touch down), 2min à 72°C. Puis 29 cycles de 95°C 1min, 1.30min à 55°C, 2min à 72°C . puis 10 min à 72°C. Le produit PCR a été purifié par gene clean et digéré *Sall/EcoRI* pour ensuite le sous cloner dans pBluescriptSK coupé (*Sall/EcoRI*).

Afin de créer le plasmide pYeplac195-GAS1, le gène GAS1 a été amplifié en utilisant les amorces suivantes: Gas1 up (*SphI*) 5'-cactgagttt**gcatgcc**gcaaacgtggaca-3' et Gas1DwnA (*BamHI*) 5'- ccggtgg**ggatccc**gaatagaatcttataaacc-3'. L'enzyme utilisée est la PFU (Stratagène) et le protocole est le suivant. 10µl de réaction PCR (PFU), 2µl de mixt dNTP (10 mM chaque), 2µl d'ADN génomique (généreusement donné par Pierre-Karl Fortier), provenant de la souche de levure By4741, 1µl de chaque amorce, 1µl d'enzyme PFU, compléter avec de l'eau jusqu'à 100µl et ajouter 100µl d'huile pour couvrir. Les conditions de PCR sont les suivantes: " Hot start" 85°C pour 5min, pendant lesquelles on ajoute la PFU, Puis 33 cycles de 95°C 1min, 1.30min à 55°C, 2min à 72°C , puis 10 min à 72°C. Pour finalement être cloner dans pYEplac195 (*SphI/BamHI*).

2.4 Les milieux de cultures

La croissance des bactéries, s'est faite dans un milieu *Luria-bertani* (LB) dont la composition est : par litre, 10g de bacto-tryptone, 5g de "yeast-extract" et 10g de NaCl. Celui-ci est autoclavé et pour obtenir le milieu solide, 15g de tech-agar est ajouté. Lorsque nous voulons faire pousser des bactéries contenant un plasmide, l'ajout de l'antibiotique de sélection requis au milieu LB à raison de 200 µg/ml dans le milieu liquide et de 150 µg/ml dans le milieu solide est effectué.

En ce qui concerne la croissance des levures, elle s'effectue soit dans un milieu YPD (complet et riche) dont la composition par litre est: 10g de "yeast-extract", 20g de peptone et 20g de dextrose. Le milieu est autoclavé et pour obtenir le milieu solide, 20g d'agar est ajouté avant la stérilisation. Lorsque la levure contient un plasmide, la croissance est faite dans un milieu synthétique minimal qui consiste-en: par litre, 6.5g de "yeast nitrogene base" sans acides aminés, 20g de dextrose et 1,73g d'un mixte d'omission tel que décrit par (Sherman et al., 1983), pour le milieu solide, 20g d'agar sont ajoutés.

2.5 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée s'est effectuée suivant les indications du protocole fournis dans l'ensemble de mutagenèse dirigée : "QuickChange Site directed mutagenesis Kit "de Stratagene, # de catalogue: 200518. Ainsi, suivant les directives du manuel, les oligos ont été dessinés et commandé. Suivant leur arrivés, ils ont été purifiés tel qu'énoncé précédemment. La mutagenèse s'effectue en utilisant l'enzyme thermorésistante PFU Turbo ADN polymérase et un appareil PCR. (thermo cycleur).

L'enzyme fait la réplication exacte des deux brins plasmidiques tout en respectant les mutations induites par les oligonucléotides-amorces. Le principe général utilise un vecteur à ADN double brins surenroulé possédant un insert d'intérêts et les deux oligonucléotides servant à introduire la mutation.. Les oligonucléotides-amorces, complémentaires, l'une de l'autre, subissent l'élongation

durant la réaction de polymérisation en chaîne. Le plasmide maître est ainsi copié en un plasmide muté contenant quelques trous. La solution (mixt des deux plasmides) est ensuite digérée par l'enzyme *DpnI* endonucléase (5'-Gm6ATC-3') qui ne digère que le plasmide méthylé, soit, le plasmide maître. Il ne reste donc que le plasmide muté amplifié et troué dans la solution (les trous correspondent à la non ligation du plasmide amplifié.)

On migre un aliquot de 10 μ l sur gel d'agarose pour visualiser l'amplification. Un aliquot de 10 μ l (bien enlever l'huile) est alors transformés dans des bactéries *E. coli* DH5 α (bactéries compétentes qui réparent et religue le plasmide amplifié) qui sont ensuite étalées sur un pétri LB-agar + ampicilline et incubées o/n. Par la suite, les clones sont recueillis et séquencé. La réaction PCR utilisée provient du manuel d'instruction et se lit comme suit. 5 μ l de tampon de réaction 10x, 50ng d'ADN plasmidique, 125ng de chaque amorce, 1 μ l de mixt dNTP (2.5mM chaque), compléter avec de l'eau jusqu'à 50 μ l, ajouter 1 μ l d'enzyme PFU et couvrir de 100 μ l d'huile minérale.

Les paramètres du thermo-cycleur sont réglés comme suit: 1 cycle de 30sec. à 95°C , 12 cycles de (30 sec à 95°C+1min à 55°C+ 2min/Kb à 68°C)suivit de la glace, pour un changement d'un seul acide aminé dans le plasmide.

2.6 Purification des oligonucléotides

Tableau IX : Oligonucléotides utilisés dans cette étude

Oligonucléotides pour la mutagenèse dirigée		
Nom de l'oligonucléotide	Séquence	Purifié
C119A up	5' GTGTTACCCAAC TTT <u>GCT</u> ACCAGCATAAAATGAAG 3' TGT=>GCT	oui
C119A dwn	5' CTCATTTATGCTGGT <u>AG</u> CAAAGTTGGGTAACAC 3'	oui
C239A up	5' CATGCACCTGTTT <u>GACGCC</u> GC CG GGCGGTGCTG 3' TGC=>GCC	oui
C239A dwn	5' CAGCACGCCCGC <u>GACGCC</u> GTCAAACAGGTGCATG 3'	oui
C276A up	5' CAAGCCAGTCGCCCT <u>GCC</u> CTGCTCCCTCTCGGTC 3' TGC=>GCC	oui
C276A dwn	5' GACCGAGAGGGAGCAG <u>GGC</u> CAGGGCGACTGGCTTG 3'	oui
C277A up	5' CAAGCCAGTCGCCCT <u>GCGCC</u> CTCCCTCTCGGTC 3' TGC=>GCC	oui
C277A dwn	5' GACCGAGAGGGAG <u>GGC</u> GCACAGGGCGACTGGCTTG 3'	oui
C291A up	5' CCACTCTGCAGAACTTCGTC <u>GCC</u> CTGTGCCCATCCTG 3' TGC=>GCC	oui
C291A dwn	5' GAGGATGGGCACAGAG <u>GGC</u> GACGAAGTTCTGCAGAGTGG 3'	oui
C276A/C277A up	5' CAAGCCAGTCGCCCT <u>GCCGCC</u> CTCCCTCTCGGTC 3' TGC=>GCC	oui
C276A/C277A dwn	5' GACCGAGAGGGAG <u>GGC</u> GGCCAGGGCGACTGGCTTG 3'	oui
Autres oligonucléotides		
Nom de l'oligonucléotide	Séquence	site de restriction
Gas1DwnA	5' ccggtgggatccggaatagaatctataaac 3'	<i>BamHI</i>
Gas1up	5' cactgagttgcatgccgaaacgtggaga 3'	<i>SphI</i>
Jym-6	5' aaagctggtcgacgaacca 3'	<i>SalI</i>
Jym-15	5' ccctgtgccccttaagatctctc 3'	<i>EcoRI</i>
Act1:F1	5' gattctggtatgttctagcg 3'	X
Act1:R1	5' ggtgaacgatagatggac 3'	X

La purification des oligonucléotides s'est effectuée de la façon suivante: À la réception de l'oligo, resuspendre le culot de façon à obtenir une concentration de $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pour un oligo de 30-40 nucléotides, préparer un gel de polyacrylamide de 10%, format séquençage [25ml de bis-acrylamide (19:1, 30%), 7.5ml TBE 10x, 37.35g d'urée, compléter le volume à 75 ml avec de l'eau déionisée, ajouter $700\mu\text{l}$ de persulfate d'ammonium (APS)10%, ajouter en dernier 15-30 μl de TEMED] .

Couler le gel, placer les peignes de séquençage en position (dents sortant du gel), bien séparé de façon à obtenir deux cavités distinctes pour y déposer les oligos. Prendre $20\mu\text{l}$ de la solution de l'oligo à purifier, (200 μg), ajouter $5\mu\text{l}$ de colorant (6X deux teintes) ainsi que $22,7\mu\text{l}$ de formamide (correspondant à 90% du volume du $25\mu\text{l}$ oligo+colorant). Chauffer l'échantillon à 90°C pendant 5 minutes et, par la suite, laisser reposer au moins deux minutes sur glace.

Déposer la totalité de l'échantillon en utilisant toute la longueur de la cavité, ne pas replacer les peignes par la suite. Faire migrer à environ 60-70Watts, jusqu'à ce que le colorant bleu foncé se positionne au 2/3 du gel (l'oligo devrait se situer ainsi entre les deux lignes de colorant). Retirer la petite vitre en laissant le gel de polyacrylamide adhérent à la grande vitre. Couvrir d'une pellicule de Saran-Wrap.

Dans une chambre noire, placer une feuille blanche sous la vitre, examiner le gel à l'aide d'une lampe UV manuelle (faible longueur d'onde) pour détecter la présence de l'oligo, (on voit une bande mauve, plus ou moins foncée). Découper la bande et la placer dans un tube Falcon de 50 ml contenant 10ml d'acétate d'ammonium (NH_4Ac) 0.5M (retirer le Cellophane de la bande et la découper en morceaux). Vortexer le tube et incuber la solution à 37°C , O/N.

Le matin suivant, centrifuger le tube pendant 10 minutes, conserver le surnageant. Resuspendre le culot dans 5ml de (NH_4Ac) 0.5M et incuber deux heures à 37°C , recentrifuger, combiner les deux surnageants dans le même tube (14-15ml) et effectuer une extraction phénol-chloroforme-isoamyl alcool. Conserver le surnageant après la centrifugation et y ajouter 2.5x éthanol 95%. Laisser précipiter à -20°C durant au moins deux jours.

Afin de récupérer l'oligo, transférer le liquide (1 falcon de 50 ml) dans deux tubes à centrifugation nalgène et centrifuger, à 15 000 rpm durant 30 minutes en

utilisant le rotor SS34 et la centrifugeuse Sorval. Conserver le surnageant, laver le culot avec 5ml d'éthanol 85%, centrifuger à nouveau pendant 30 minutes à 15000 rpm. Conserver le surnageant, laisser sécher le culot (tube inversé) pendant 10 à 20 minutes, pas plus. Resuspendre le culot dans 100 μ l de Tris-HCl 10 mM (pH 7.5). Vérifier la concentration de l'oligonucléotide sur gel d'agarose, ajuster la concentration de l'oligonucléotide à environ 100 ng/ μ l.

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

La transformation de bactérie est effectuée selon le protocole décrit dans (Sambrook et al., 1989). La préparation de cellules compétentes d'*E. coli*, une souche conservée à -80°C de DH5 α est utilisée, les cellules sont striées sur un pétri LB, laissé o/n à 37°C . Une colonie isolée est inoculée dans 5ml de LB contenant 6mM de MgSO_4 o/n. Le lendemain, la culture est diluée dans 200 ml de LB + 6mM de MgSO_4 préalablement chauffé, puis laissée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0.48 à 550nm. Lorsque la densité est atteinte, les cellules sont refroidies sur glace 5 min puis centrifugées à 4°C dans des tubes (falcons) de 50 ml. on resuspendre doucement chaque culot dans 20 ml de TFB I froid (30mM de KOAc, 10mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mM de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100mM de KCl, 15% volume/volume (v/v) glycérol-eau) et on laisse les cellules sur glace durant 10 minutes pour ensuite centrifuger à 4000rpm durant 10 minutes à 4°C . Le culot est ensuite resuspendu dans 2ml de TFB II froids 10mM de MOPS (3-[N-morpholino] propane sulfonic acid), 75mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM de KCl, 15 % v/v glycérol-eau). Maintenant que les cellules sont compétentes, aliquoter à 200 μ l et laisser sur glace sèche durant 15 minutes avant de ranger à -80°C . Lors de transformation bactérienne, les cellules compétentes déjà congelées sont généralement utilisées. Un aliquot de cellules de 200 μ l est décongelé et placé sur glace. L'ADN à transformer (environ 50 ng ou au plus 1/10 v/v des cellules) est ensuite ajouté et on laisse reposer sur glace pour 30 minutes. Par la suite, on fait subir aux cellules un choc thermique à raison de 90 secondes dans le bain à 42°C ou 5 minutes à 37°C . Puis 1ml de LB

est ensuite ajouté et on laisse pousser à 37°C durant 1 heure. Les cellules sont ensuite centrifugées et resuspendues dans 100 µl de LB puis étalées sur un pétri LB-agar contenant l'antibiotique de sélection requis. Les transformant sont habituellement visible après 15 heures de croissance à 37°C.

2.8 Extraction de plasmides chez *E.coli*

La préparation d'ADN plasmidique d'*E.coli* est effectuée selon la méthode de la lyse alcaline retrouvée dans (Sambrook et al., 1989).

2.9 Transformation de plasmides et délétion de gènes dans *Saccharomyces cerevisiae*

La méthodologie utilisée pour effectuer des transformations d'ADN plasmique et pour la délétion de gène par recombinaison homologue est décrite par (Ito et al., 1983). Les levures inoculées dans 1ml de milieu YPD ou minimal, sont poussées pendant 24 heures à 30°C. Par la suite, les levures sont diluées 5 fois dans du milieu frais et sont incubées à 30°C durant 3heures (phase exponentielle). Les cultures sont ensuite centrifugées pour en recueillir les levures (3000 rpm, 1min.) qui sont ensuite lavées une fois avec de l'eau déionisée stérile, puis une autre fois avec 1 ml de TE/LiAc (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, 100mM LiAc,pH 7.5. la solution est centrifugée, 1 min à 12 000 rpm, puis le culot de levures est resuspendu dans 150µl de TE/LiAc. (bon pour trois transformations). À 50 µl de levure, 50µg d'ADN de sperme de saumon soniqué est ajouté, de même que 1µg d'ADN plasmidique à transformé (pas plus que 1/10 du volume) ou de cassette de délétion *imp2Δ::LEU2*. Ensuite, 300µl de solution PEG/TE/LiAc (TE/LiAc 1x 40% PEG₃₃₅₀) sont ajoutés. Les levures sont ensuite incubées à 30 °C durant 2 heures puis subissent un choc thermique de 15 minutes à 42°C. Elles sont ensuite

centrifugées puis resuspendues dans 100 μ l d'eau stérile pour être finalement étalées sur un pétri de milieu sélectif.

2.10 Essais de dilution.

Les cellules sont poussées 2 heures dans 60 à 100 μ l de YPD à une D.O. de 600. Les pétri coulés contiennent 20 ml de YPD-agar avec ou sans la drogue analysée selon la concentration indiquée dans le tableauX suivant. Une fois les pétris coulé, ceux-ci sont séchés à 37°C dans un incubateur couvercle enlevé. Lorsque les pétris sont secs, on y dépose les cellules selon les dilutions suivantes. 5 μ l du 100 μ l de culture initiale sont déposés sur le pétris, puis on dilue 1:5, 1:10 et 1:20 en déposant toujours 5 μ l de chaque dilutions sur le pétris.

Tableau X : Concentration des drogues utilisées pour les essais de dilution et les pétris de gradients.

# de Figure	Drogue utilisée	Concentration []
Figure:1	Bléomycine	1 μ g/ml
Figure:3	Bléomycine	1 μ g/ml
Figure:7	SDS	14 μ l d'un stock de 10% dans 20 ml
Figure:7	Calcofluor white	18 μ l d'un stock de 100 μ g /ml
Figure:7	Caféine	300 μ l de 0.66mM stock
Figure:10B	Bléomycine	1 μ g/ml

2.11 courbe de survie

Puisque aucune variation de sensibilité entre les souches mutantes et sauvages n'a pu être détectées sur des essais de dilutions à la bléomycine, Une courbe de survie (H₂O₂ et bléomycine) avec ces souches a été effectuée. Les cellules sont inoculées dans 1 ml de milieu sélectif et poussées o/n. Les cellules sont ensuite diluées (400µl dans 2ml) dans le même milieu et poussées 3-4 heures jusqu'à une D.O_{600nm}= 1.0. Les cellules sont ensuite centrifugées, lavées (tampon phosphate) et resuspendue dans du tampon phosphate 50mM pH 7.0 (61.5ml K₂HPO₄ 1M pH 7.0 + 38.5 ml KH₂PO₄ 1M pH 7.0 pour faire le stock 1M qui est ensuite dilué pour faire le tampon à 50mM) à une D.O_{600nm}= 1.0. Les cellules sont ainsi traitées avec du H₂O₂ 3.08mM et bléomycine 1mg/ml, des aliquots (50µl) sont pris à des temps donnés, et dilué 10⁻⁴ avant d'être étalés (100µl de dilution 10⁻⁴) sur des pétris YPD. Les pétris sont incubés à 30°C deux jours et le décompte des colonies s'effectue après deux jours de croissance.

2.12 Buvarpage western

Pour vérifier le patron d'expression des protéines mutées, des essais de buvardage western ont été effectués. Les levures ont été inoculées dans du milieu sélectif (-URA/Raffinose) auquel on a ajouté 0.65% de galactose (induction du promoteur GAL1) et laissé induire o/n, ou poussée o/n dans du milieu sélectif et induites durant 4 heures avant l'extraction. Par la suite, les cellules sont centrifugées à 4°C (4000 rpm, 2minutes), puis lavées avec de l'eau stérile et recentrifugées. Le culot est ensuite resuspendu dans 200µl de tampon d'extraction (50mM Tris-HCL pH 8.0, 50mM NaCl, 5% glycérol, 1mM EDTA et 0.5g/ml de pepsatine, aprotinine et leupeptinine) puis, environ 200µl de billes de verre (500µm de diamètre) sont ajoutées. L'extraction se fait par friction à l'aide d'un appareil appelé Bead Beater, (5000 rotations/minutes pendant 20 secondes. 5 cycles sont alors effectués en laissant une minute de repos sur glace entre chaque cycles. Les débris cellulaires et

les billes sont enlevés par une centrifugation à basse vitesse (3000 rpm, 5 minutes) puis, les extraits protéiques sont conservés à - 80°C. La concentration de chaque échantillon a été déterminée par la méthode de Bradford (1976).

Pour ce qui est du buvardage western, les protéines (60 µg) sont migrées sur un gel de polyacrylamide SDS-page 15 % . Le transfert s'effectue généralement o/n et les membranes utilisées sont faites de nitocellulose Hybound C (Amersham). Afin de visualiser la qualité du transfert, un rouge de Ponceau est effectué avant le blocage de la membrane avec du TBSET-lait (10mMTris-HCl pH 7.5) 150mM NaCl, 5% de lait en poudre écrémé, 1mMEDTA et 1% tween). Le protocole standard est décrit par (Gershoni et al ., 1983). Après le blocage de la membrane, l'anticorps primaire, anti-GFP (Clontech) est dilué 1/5000 dans du TBSE 1X sans Tween) et la membrane y est exposée o/n à 4°C. La membrane est ensuite lavée avec le même tampon de blocage puis le deuxième anticorps (secondaire, anti -souris couplé à la peroxydase, Amersham dilué 1/2500) est ajouté. La membrane y est exposée une heure à la température de la pièce. Suivent le lavage avec le même tampon de blocage puis la révélation se fait par chemiluminescence (Dupont-NEN) tel que décrit par le manuel.

2.13 Induction et visualisation des cellules.

L'induction des cellules transformées avec le plasmide sauvage pYES-GFP-IMP2 et mutant, pYES, GFP-IMP2-C5x, s'effectue de la même façon que décrite précédemment dans la section buvardage western. Croissance o/n dans du milieu - URA/raffinose + 0.65% galactose. Les cellules sont ensuite lavées et placées sur une lame à microscope. Elles sont ainsi visualisées (1000X) avec le filtre I3-FITC (Leica) et photographiées avec l'aide d'une caméra numérique (CoolSnap) attachée au microscope à fluorescence (Leitz) puis traité par le programme informatique Cool Snap).

2.14 Pétris de gradient

La méthodologie utilisée pour les tests sur pétris de gradient à la bléomycine est basée sur celle décrite par (Cunningham et al., 1986) avec quelques modifications. À 30 ml de YPD agar stéril (55°C) est ajouté 10µl de bléomycine (10mg/ml). Le mélange est versé dans un pétri carré (9cm/9cm). Le pétris est ensuite déposé sur la paillasse, de façon inclinée en le plaçant sur une pipette de 5ml en plastique, à la hauteur de la première division (environ 1.2 cm du bord) ce qui provoque un angle d'environ 45°. Lorsque l'agar est bien figé, le pétris est déposé à plat sur la paillasse et 37.5ml de YPD agar (55°C) sans drogue y est déposé en s'assurant de couvrir tout le pétri. Quand celui-ci a bien durci, il est séché à 37°C, inversé, couvercle enlevé, durant 1 heure.

Les cultures sont poussées o/n dans 1 ml de milieu sélectif ou dans du YPD jusqu'à l'atteinte de la phase stationnaire. Un aliquot de 100µl est alors prélevé et dilué dans 500µl de YPD agar 1% (55°C). après avoir bien mélangé, on étale sur une lame de microscope stérile en utilisant toute la longueur. Le cadre d'une lame de microscope est trempé dans la solution étalée, puis une délicate impression sur la surface du pétri (parallèle au gradient) est effectuée. Le pétri est ensuite incubé à 30°C jusqu'à l'obtention de la croissance cellulaire.

2.15 Buvarpage northern

La technique du buvardage northern est basée sur le protocole décrit dans Short protocols in molecular biology (third edition.), (édition Wiley 1999) avec quelques modifications mineures

III. RÉSULTATS

3.1 *IMP2* ne semble pas avoir recours à ses cystéines pour exercer sa fonction antioxydante.

Il a été démontré que la protéine Imp2 est un activateur de transcription (Masson et al., 1996). Bien que certaines facettes de ce gène aient été analysées jusqu'à ce jour, dont son implication au niveau des stress oxydants (introduction section 1.5.), la fonction de ce gène demeure inconnue. Afin de caractériser le rôle du gène *IMP2* en réponse à la bléomycine et aux autres stress oxydants tel le peroxyde d'hydrogène, nous avons analysé la structure du gène et découvert plusieurs domaines d'intérêts (Masson et al., 1996). De plus, la comparaison de la structure de l'activateur de transcription *IMP2* avec celle de certains autres activateurs de transcription tel *YAP1* de *Saccharomyces cerevisiae* (Jones et al, 1999) *PAP-1* de *Schysosaccharomyces pombe* (Jones et al, 1999) et *OXY-R* de *Escherichia coli* (Aslund et al, 1999) nous ont menés vers une nouvelle voie d'étude.

En effet, la bactérie *E.coli* utilise l'activateur de transcription *OXY-R* dont les cystéines C199 et C208 forment des ponts dissulfides lors de la présence de stress oxydants. La protéine Oxy-R ainsi activée, active la transcription de gène requis pour la réponse à ces stress (Aslund et al, 1999). Plusieurs articles depuis 1997 tendent à démontrer que l'activateur de transcription de *saccharomyces cerevisiae* *YAP1*, utiliserait le même mode d'activation (Kuge et al.,1997; Kudo et al., 1999) résumé dans (Toone et al., 2001). Dans cette étude, le gène *IMP2* est investigé et bien qu'aucun homologue du gène *IMP2* n'a encore été identifié chez les cellules de mammifère, on y retrouve plusieurs mécanismes cellulaires homologues à ceux observés chez la levure : Le gène *RAD2* de *Saccharomyces cerevisiae* correspond à une endonucléase et son absence résulte en un phénotype de photosensibilité et de prédispositions au cancer, alors que chez l'humain, le gène homologue est *XP-G* et son absence ou mauvais fonctionnement cause la maladie *Xenoderma Pigmentosum*. (Foury., 1997). Puisque la protéine Imp2 est un activateur de transcription impliqué dans la résistance aux stress oxydants et qu'elle possède cinq cystéines dans sa structure, nous avons comme premier objectif décidé de vérifier si Imp2 exerce sa fonction antioxydante par l'entremise de ses cystéines comparativement aux autres activateurs de transcriptions mentionnés ci-haut.

Aucun anticorps dirigé contre Imp2 n'a encore été produit, nous avons utilisé une fusion de la protéine GFP (Green fluorescent protein) avec la protéine Imp2 afin de pouvoir identifier la protéine sur buvardage western (la GFP a un poids moléculaire considérable, 27 kDa, mais ne modifie généralement pas la fonction des protéines fusionnées). De plus, la GFP, extraite de *Aequorea victoria* a la propriété d'émettre de la fluorescence verte lorsqu'elle est excitée sous la lumière UV. (Prasher et al., 1992). Ainsi, nous avons muté chacune des cinq cystéines de la fusion GFP-Imp2 séparément pour des alanines, (acide aminé polaire pour un hydrophobe) afin de déterminer si ces altérations de la structure auront un effet sur la fonction et/ou la localisation de la protéine Imp2. Tel qu'indiqué à la figure 9, nous avons effectué des essais de dilutions avec chacun des mutants afin de déterminer l'effet des mutations sur la fonction de la protéine en réponse à un stress oxydant. On peut ainsi voir, puisque chaque plasmide muté complémente un mutant délété en *imp2Δ*, qu'aucune des cystéines mutées séparément ne semblent jouer de rôle dans la fonction protectrice de la protéine Imp2 face à la bléomycine.

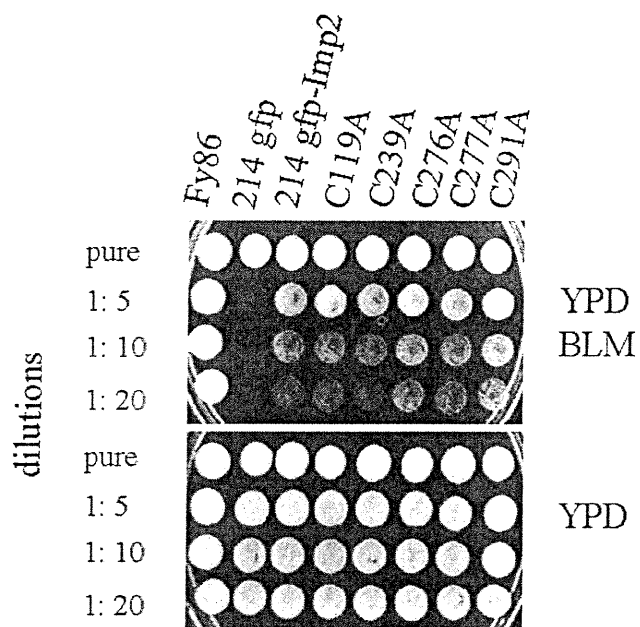


Figure9 : Essais de dilution mesurant la sensibilité à la bléomycine de la souche sauvage, délétée en *imp2Δ* et de chacun des mutants (Cys –Ala) dans un plasmide multicopie.

(Le pétri *Ypd-Blm* contient $1\mu\text{g/ml}$ de bléomycine). Dans l'ordre, la souche Fy86 est la souche sauvage, 214 *gfp* et 214 *gfp-Imp2* sont isotypiques de Fy86 mais délétée en *IMP2Δ* dans laquelle on a rajouté respectivement le plasmide vide pYES-GFP et le plasmide pYES-GFP-*IMP2* (wt). Les cinq autres souches sont isotypiques de 214*gfp-Imp2* contenant chacune une mutation à une cystéine différente.

3.2 Les protéines Imp2 mutantes ont le même patron d'expression que la protéine sauvage

Afin de valider les premiers résultats obtenus, nous avons effectué un essai de buvardage western pour déterminer si chacune des protéines mutées avait le bon patron d'expression

(figure 10). Ainsi dans chaque souche dont la protéine Imp2 est mutée dans l'une ou l'autre de ces cystéines, la protéine Imp2 mutée possède un patron d'expression identique à la protéine Imp2 sauvage.

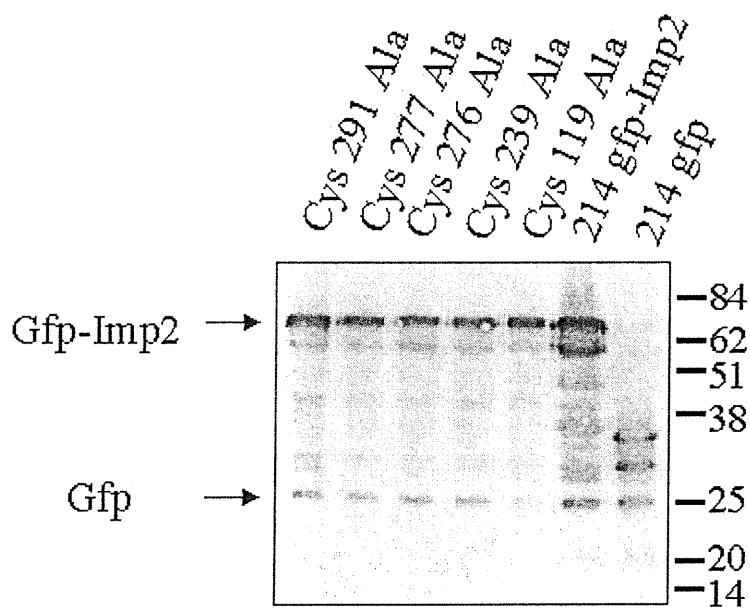


Figure10 : Buvardage western identifiant le patron d'expression de chacune des protéines Imp2, sauvage et mutantes.

(Les mêmes souches qu'à la figure 1 ont été utilisées et la détection s'est fait par l'entremise d'un anticorps anti- GFP.) la dernière ligne représente la souche isogénique de Fy86, délétée en *imp2Δ* et contenant le plasmide vide pYES-GFP, l'avant dernière contient le plasmide pYES-GFP-IMP2 et les cinq premières souches sont isogéniques de 214 GFP-IMP2, contenant chacune, une mutation à une cystéine différente.

3.3 La localisation cellulaire (en situation de stress thermique et en condition normale) des protéines Imp2 sauvage et mutantes ne varie pas en fonction des mutations.

Afin d'approfondir les résultats, nous avons voulu connaître l'effet de ces mutations sur la localisation cellulaire de la protéine Imp2, nous avons comparé la localisation cellulaire de la protéine Imp2 sauvage avec celle de chacune des protéines mutantes. Nous avons observé au microscope à fluorescence la fusion protéique Gfp-Imp2 lors de conditions normales et sous l'effet d'un stress thermique. (Brodeur., 1999, non publié, ayant démontré une variation de localisation cellulaire réversible de la protéine Imp2 dans des conditions de stress thermique.) Dans le tableau XI, on voit l'énumération de chaque mutant et le résumé de l'effet de ces mutations concernant la localisation cellulaire de Imp2 mutante et la réponse face à un stress thermique. On peut voir que muter les cystéines de Imp2 n'affecte pas sa fonction en réponse au choc thermique et que la localisation cellulaire des protéines Imp2 sauvage et mutantes ne varie pas.

Tableau XI : Effets des mutations sur la localisation cellulaire de Imp2 avec et sans traitement thermique.

Protéine Imp2	Localisation cellulaire de Imp2 sous des conditions normales	Localisation cellulaire de Imp2 en réponse à un choc thermique
Type sauvage IMP2	Cytoplasme et noyau	Formation d'agglomération cytoplasmique (réversible)
Mutant Imp2 C119A	Cytoplasme et noyau	Formation d'agglomération cytoplasmique (réversible)
Mutant Imp2 C239A	Cytoplasme et noyau	Formation d'agglomération cytoplasmique (réversible)
Mutant Imp2 C276A	Cytoplasme et noyau	Formation d'agglomération cytoplasmique (réversible)
Mutant Imp2 C277A	Cytoplasme et noyau	Formation d'agglomération cytoplasmique (réversible)
Mutant Imp2 C291A	Cytoplasme et noyau	Formation d'agglomération cytoplasmique (réversible)

3.4 Aucune perte de fonction de la protéine Imp2 n'est occasionnée par les mutations individuelles.

Jusqu'à maintenant, chacune des mutations ont été effectuées dans un plasmide multicopie contenant une fusion de Gfp-Imp2 sous le contrôle du promoteur inductible Gal-1 du plasmide pYES 2.0. Ainsi, une diminution de la fonction de faible pourcentage occasionnée par chaque mutation a pu ne pas être perçue compte-tenu que les protéines sont sur-exprimées dans un plasmide multicopie. Pour s'assurer que les mutations individuelles (des cystéines) de la protéine Imp2 n'ont vraiment aucun effet sur sa fonction et que les phénotypes observés sont contrôlés par le promoteur du gène *IMP2*, nous avons placé la protéine sauvage ainsi que chacune des protéines mutantes dans un plasmide simple copie et sous le contrôle du promoteur du gène *IMP2*.

Comme on peut le voir à la figure 11, nous avons procédé aux mêmes essais de dilution qu'à la figure 9 en utilisant les souches contenant les plasmides simples copie et les gènes *IMP2* sauvage et mutés sous le contrôle du promoteur du gène *IMP2*. Les résultats sont cependant identiques, aucune mutation n'affecte la fonction de la protéine Imp2 face à la bléomycine même sous le contrôle du gène *IMP2*.

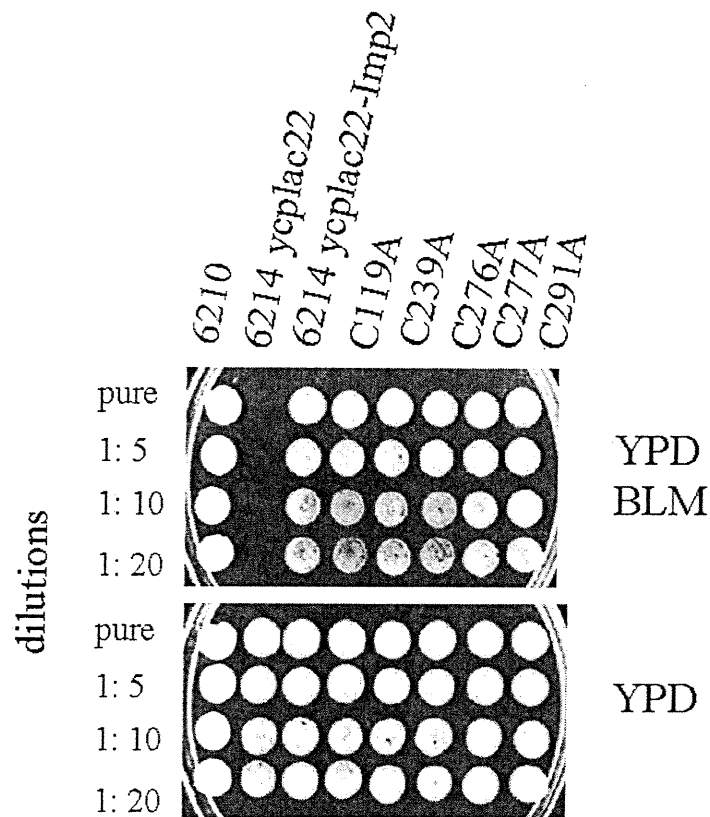


Figure 11 : Essais de dilution de la souche sauvage, délétée en *imp2Δ* et de chacun des mutants (Cys -Ala) dans un plasmide simple copie.

(Le pétri *Ypd-Blm* contient $1\mu\text{g/ml}$ de bléomycine). Dans l'ordre, la souche Dry6210 est la souche sauvage, 6214 *ycplac22^E* et *ycplac22^E-Imp2* sont isotypiques de 6210 mais délétées en *imp2Δ* dans laquelle on a rajouté respectivement le plasmide vide *pYcplac22^E* et le plasmide *pYcplac22^E-595/IMP2* (gène sauvage et son promoteur). Les cinq autres souches sont isogéniques de 6214 *pYcplac22^E-595/IMP2* contenant chacune une mutation à une cystéine différente.

3.5 Les cystéines de Imp2, mutées séparément, n'ont aucun effet sur la survie des cellules face à la bléomycine et au peroxyde d'hydrogène.

Les essais de dilution peuvent ne pas être assez sensibles pour évaluer la résistance ou l'altération de la fonction d'un gène, nous avons donc, à la figure 12, effectué des courbes de survie avec une dose sub-léthale de bléomycine et/ou de peroxyde d'hydrogène afin de déterminer si le fait de muter les cystéines de Imp2 séparément affecte la survie des cellules face à deux stress oxydants. Comme on peut le constater, les mutants ne sont significativement pas sensibles à la bléomycine (résultats non inclus) ni au peroxyde d'hydrogène. En effet, ceux-ci ont un profil de survie semblable aux souches dont le gène *IMP2* est sauvage.

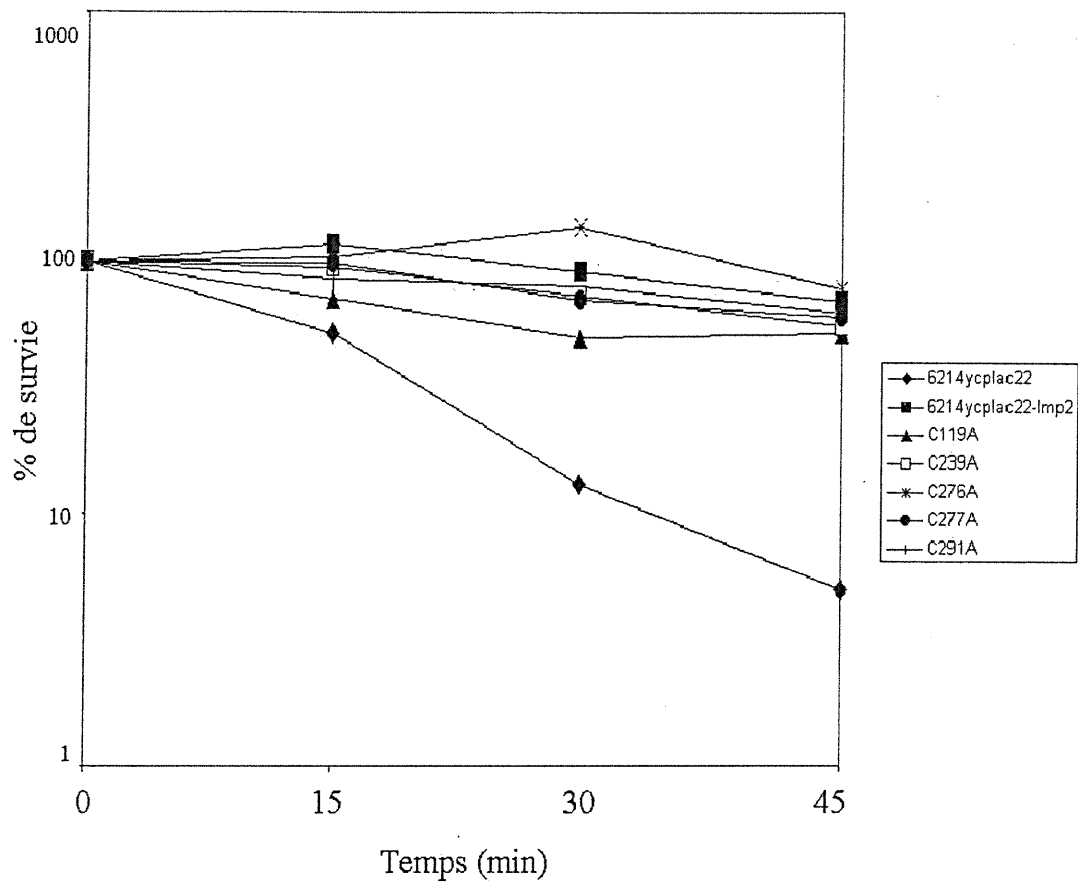


Figure12 : Courbe de survie des souches sauvage et mutantes face à la bléomycine et au peroxyde d'hydrogène.

La courbe de survie face à la bléomycine n'est pas présentée dans ces résultats mais reflète le même profil de survie pour chacune des souches. Le losange fermé représente la souche délétée en *imp2Δ* dans laquelle on a rajouté le plasmide vide, pYcplac22^E, le carré fermé est isogénique de la précédente dans laquelle on a rajouté le plasmide pycplac22^E-595/*IMP2* (représentant la souche sauvage). Les autres séries représente les souches isogénique à 6214 pycplac22^E-595/*IMP2* contenant chacune la mutation indiquée soit une cystéine mutée pour une alanine.

3.6 Aucune combinaison de cystéines mutées n'a un effet sur la fonction de la protéine Imp2.

Puisque nous la fonction de la protéine Imp2 n'est pas affectée en relation avec l'une ou l'autre des cystéines mutées individuellement, nous avons décidé d'effectuer des combinaisons de mutations. Le tableau suivant indique un résumé des combinaisons de mutations effectuées et des phénotypes observés face à la bléomycine. On peut en outre voir que même en mutant les 5 cystéines dans le gène *IMP2*, celui-ci demeure fonctionnel procurant ainsi une protection contre la bléomycine.

Tableau XII : Résumé des combinaisons de cystéines mutées dans la protéine Imp2 et phénotype de résistance à la bléomycine.

Protéine Imp2 Sauvage et mutantes	Résistance à la bléomycine
Type sauvage Imp2	Résistant
Mutant Imp2 C119A	Résistant
C239A	Résistant
C276A	Résistant
C277A	Résistant
C291A	Résistant
C119A/C239A	Résistant
C119A/C276A	Résistant
C119A/C277A	X
C119A/C291A	Résistant
C239A/C276A	Résistant
C239A/C277A	Résistant
C239A/C291A	Résistant
C276A/C277A	Résistant
C276A/C291A	X
C277A/C291A	Résistant
C119A/C239A/C276A	X
C119A/C239A/C277A	X
C119A/C239A/C291A	Résistant
C119A/C276A/C277A	Résistant
C119A/C276A/C291A	X
C119A/C277A/C291A	X
C239A/C276A/C277A	Résistant
C239A/C276A/C291A	X
C239A/C277A/C291A	X
C276A/C277A/C291A	Résistant
C119A/C239A/C276A/C277A	Résistant
C119A/C239A/C276A/C291A	Résistant
C119A/C239A/C277A/C291A	X
C119A/C276A/C277A/C291A	Résistant
C239A/C276A/C277A/C291A	Résistant
C119A/C239A/C276A/C277A/C291A	Résistant

3.7 Muter les cinq cystéines de la protéine Imp2 en même temps n'affecte pas la localisation cellulaire de la protéine

Nous avons vu précédemment que la fonction antioxydante de la protéine Imp2 était conservée malgré la mutation combinée de ces cinq cystéines. Nous avons voulu savoir si ces mutations pouvaient affecter la localisation cellulaire de la protéine dans des conditions normale et sous condition de stress thermique. La figure 13 nous démontre bien que les mutations combinées des cinq cystéines de Imp2 ne cause aucune variation dans la localisation cellulaire de la protéine et se présente sous la forme d'un doublet (buvardage western) lors d'un stress thermique. L'agglomération cytoplasmique réversible typique de la réponse de Imp2 sauvage face à un choc thermique est aussi observée chez le quintuple mutant.

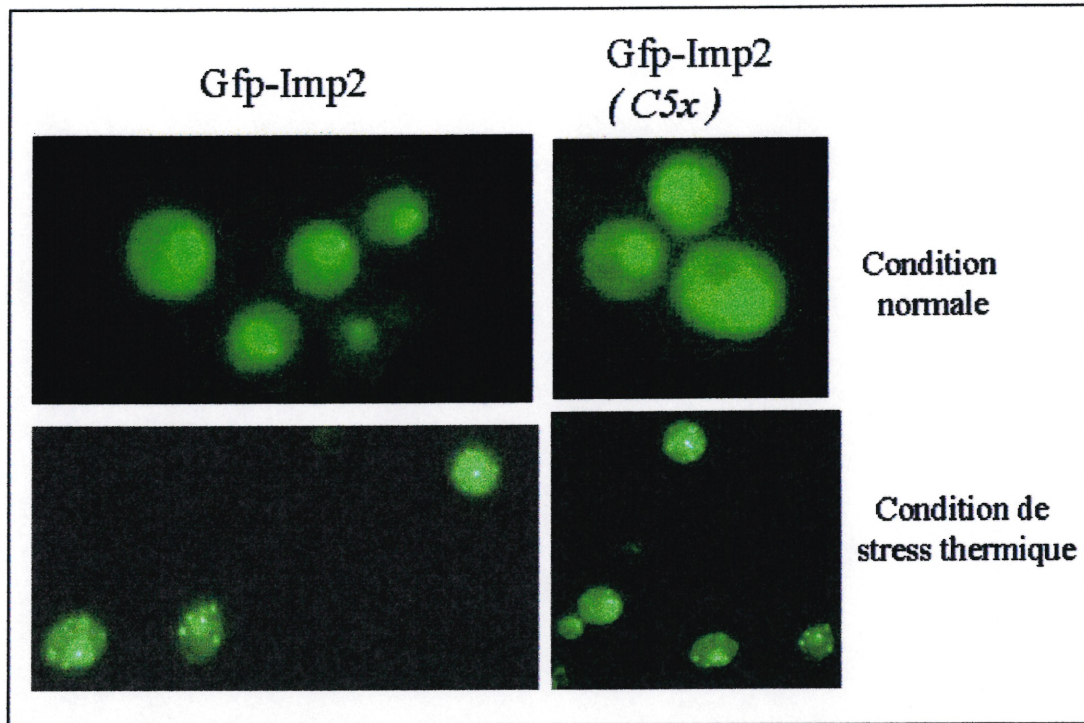


Figure13 : Localisation cellulaire des protéines Imp2 sauvage et mutées, en présence ou en absence de stress thermique.

GFP-Imp2 est exprimée dans la souche 214, isogénique à Fy86 , mais déléetée en *imp2Δ*. Gfp-Imp2 (C5x) est identique à la précédante exceptée pour les mutations dans les cinqs résidus cystéines de la même protéine. Le choc thermique fut exécuté en plaçant les cellules à 42°C durant 20 minutes.

3.8 Le patron de migration de la protéine Imp2 ne varie pas lorsque ces cinq cystéines sont mutées en même temps.

Des résultats non publiés nous indique que la protéine Imp2 pourrait subir des modifications post-traductionnelles selon le stress subit. (Leduc et Hoflack 1998 non plublié) En effet, la protéine Imp2 se révèle principalement sur buvardage western, sous forme de doublet. Lors d'une tentative de purification de la protéine, nous l'avons fait passer sur une colone de DEAE et éluée avec du tampon NaCl, 0.6 M. Une seule bande est alors apparue sur le buvardage western indiquant la possibilité que la protéine existe sous au moins deux formes. Nous avons donc voulu savoir si le fait de muter les cinq cystéines de Imp2 en même temps, affecterait la capacité de la protéine à se retrouvée sous forme de doublet. On peut voir à la figure 14 que le patron de migration de la protéine mutée n'est pas différent de celui de la protéine sauvage.

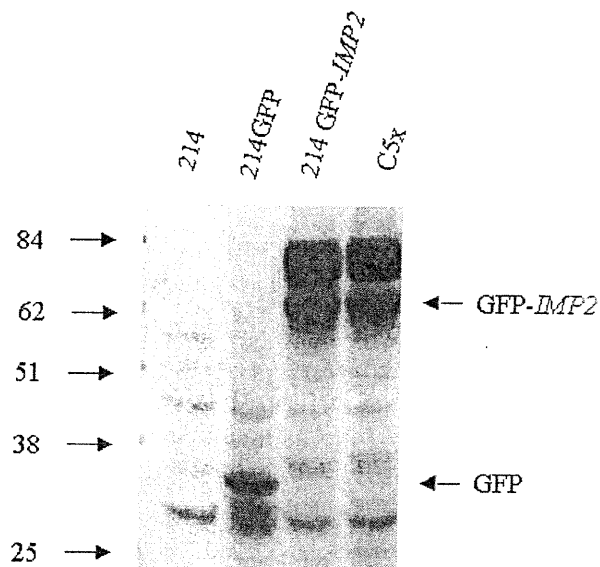


Figure14 : Buvardage western identifiant le patron d'expression de chacune des protéines Imp2, sauvage et mutée.

(La détection s'est fait par l'entremise d'un anticorps anti- GFP.) La souche 214 est isogénique de Fy86 dans laquelle on a délété le gène *imp2Δ*. Dans la ligne deux, on peut voir la souche délétée en *IMP2Δ* dans laquelle on a ajouté le plasmide vide pYES-GFP. La ligne trois représente la souche délétée en *imp2Δ* dans laquelle on a ajouté le plasmide pYES-GFP-IMP2 et la dernière ligne (c5x) représente la même souche que la précédente contenant cependant le cinq mutations aux cystéines.

3.9 Implication de la protéine Imp2 au niveau de la paroi cellulaire.

Tous les résultats précédants nous démontrent que les cystéines de la protéine Imp2 ne sont pas impliquées dans la fonction antioxydante de la protéine ni dans la modification de la localisation cellulaire de la protéine lors d'un stress thermique. Cette étude de la structure/fonction du gène nous a indiqué que *IMP2*, en tant qu'activateur (co-activateur de transcription) ne réagit pas aux stress oxydants de la

façon dont on pensait c'est-à-dire par le biais de ses cystéines, comme le fait *Yap1* de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pap1* de *S. pombe* ou *OxyR* de *E. coli*.

Ceci nous laisse supposer que le gène *IMP2* pourrait accomplir sa fonction antioxydante en utilisant un autre mécanisme, tel une activation par une interaction protéine/protéine comme le fait la protéine *Yap1* qui par le biais de ces Leucines (NES), interagit avec le transporteur *Crn-1* dans *Saccharomyces cerevisiae* (Yan et al., 1998). En effet, *Imp2* possède un domaine riche en leucines qui par analogie avec d'autre motif semblable pourrait être impliqué dans une interaction protéine/protéine. *Imp2* possède aussi un domaine riche en arginine/sérine ce qui peu laisser croire qu'une phosphorylation est possible faisant de cette modification post traductionnelle, un mode d'activation possible. Par exemple, comme le fait le gène *Pho4* de *Saccharomyces cerevisiae* qui est phosphorylé par *pho80/pho85* sur ses sérines (NES) et ainsi peut être exporté hors du noyau et accomplir sa tâche (Komeili et al., 1999). La possibilité que *Imp2* contrôle une pompe ou une enzyme de détoxification ne peut être écartée puisque peu de chose sur *Imp2* sont présentement connues.

Puisque les résultats de deux articles ; (Lipke et al., 1993 et 1995) démontrent que la bléomycine attaque et brise la paroi cellulaire sensibilisant ainsi encore plus les cellules à son effet et puisqu'un mutant délété en *imp2Δ* est hypersensible à la bléomycine, nous avons envisagé la possibilité que *Imp2* soit impliqué au niveau de la paroi cellulaire ou puisse contrôler des gènes en relation avec le maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire de la levure.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé le mutant *imp2Δ* et le mutant *gas1Δ* face à différents agents nécessitant le bon fonctionnement de la paroi cellulaire pour la survie. Tels: calcofluor white (Carnero et al., 2000), caféine (Kimura et al., 1999), SDS (Naik et al., 1988). Les mutants *gas1Δ* ont une défaillance en l'organisation de la paroi cellulaire et par conséquent sont sensibles aux agents nécessitants une paroi cellulaire fonctionnelle pour la survie.

3.9.1 Agents nécessitant une paroi cellulaire fonctionnelle de la cellule pour la survie

Certains agents ont été caractérisés pour leurs effets dirigés contre la paroi cellulaire. Ainsi, des mutants sensibles à ces agents ont presque tous un problème dans le bon fonctionnement ou l'intégrité de la paroi cellulaire (Naik et al., 1988). Un premier exemple est le Calcofluor white, il s'agit d'une teinture fluorescente cationique qui se lie covalamment à la chitine contenue dans la paroi cellulaire et affecte le bon assemblage de celle-ci (Elorza et al., 1983).

En deuxième, il y a le SDS qui est connu pour extraire les protéines des membranes (Tukmachev et al., 1979, Igual et al., 1996). Ainsi, un traitement au SDS cause des perforations au niveau de la membrane cellulaire et ainsi affecte sa stabilité et son intégrité (Naik et al., 1988).

Puis il y a aussi la caféine, un méthylxantine qui agit comme un inhibiteur de la phosphodiesterase de l'AMPc. La dégradation de l'AMPc ne se fait donc pas et il y a une accumulation de AMPc dans la cellule. L'AMPc agit comme second messenger et est située au niveau de la membrane cellulaire (Neuhaus et al., 1982). L'AMPc peut transporter un signal provenant d'une hormone ou peut même transporter de petits acides aminés ou autres métabolites dans la cellule. Certaines hormones augmentent la perméabilité des membranes aussi, l'accumulation d'AMPc dans la cellule causée par la caféine, permet à plusieurs signaux d'être effectif plus longtemps dans la cellule risquant une déstabilisation de celle-ci. L'AMPc permet l'activation d'une protéine kinase qui peut phosphoryler la phosphorylase kinase, mais aussi plusieurs autres protéines dont certaines histones, des protéines ribosomales, des protéines de la paroi cellulaire, de membranes mitochondriales, de microsomes, de lysosome etc...(Neuhaus et al., 1982). Aussi, puisque l'AMPc est située au niveau de la membrane cellulaire, on peut penser qu'une accumulation de celle-ci pourrait mener à une déstabilisation (Lehninger 1975).

En deuxième lieux, il a été démontré dans plusieurs articles (Igual et al., 1996, Turchini et al., 2000, Costigan et al., 1992, Levin et al., 1992) qu'en général, un mutant sensible à la caféine est déficient dans la voie de la protéine kinase c.

Cette protéine est activée en réponse à un stress osmotique (ressenti par une modification-étirement de la paroi cellulaire) et permet l'ouverture de canaux ioniques. (Turchini et al., 2000) Une augmentation de l'AMPc peut aussi intervenir au niveau de l'échange ionique et signalétique cellulaire (concentration de Na^+ , Ca^{2+}) (Stryer 1988). Finalement, il est démontré dans un article (Thevelein et al., 1999) que l'AMPc interagit avec la protéine kinase A et affecte négativement plusieurs éléments de réponse aux stress dont des transporteurs membranaires, des récepteurs nutritifs etc... Ainsi, une accumulation d'AMPc dans la cellule causée par la caféine peut affecter grandement la cellule surtout au niveau membranaire et énergétique.

Ainsi, si on découvrait qu'un mutant *imp2Δ* avait des phénotypes de sensibilité semblable à ceux d'un mutant *gas1Δ* face à ces agents, cela pourrait indiquer que Imp2 aurait un rôle à jouer au niveau de la paroi cellulaire directement. Dans la figure 15, on peut voir que les deux mutants, sont sensibles, à des degrés différents, aux agents nécessitant la paroi cellulaire fonctionnelle pour la survie. Ainsi, on peut en déduire que Imp2 a un rôle à jouer au niveau de la paroi cellulaire de la levure.

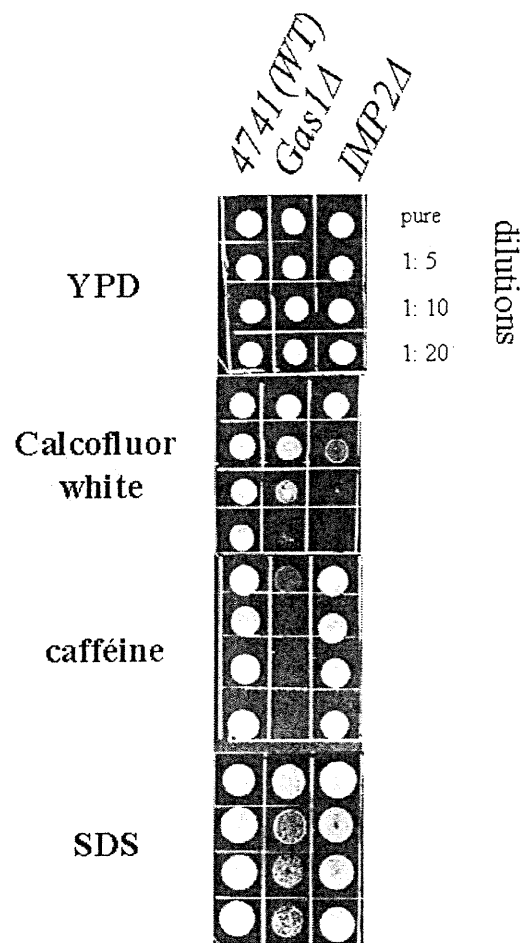


Figure 15 : Essais de dilution comparant la sensibilité des mutants *imp2Δ* et *gas1Δ* face à différentes drogues nécessitant une paroi cellulaire intacte pour la survie.

La souche By 4141 est la souche sauvage, les deux autres souches sont isogéniques de By 4741 dans laquelle on a délété respectivement le gène *gas1Δ* et *imp2Δ*.

Les résultats de la figure 16 quant à elle, nous démontrent que la paroi cellulaire est requise pour la résistance face à la bléomycine (*imp2Δ* et *gas1Δ* sont sensibles), cependant, puisqu'un mutant *imp2Δ* est beaucoup plus sensible qu'un mutant *gas1Δ*, il se peut que l'absence de Imp2 puissent nuire à un autre niveau que la paroi cellulaire en réponse à la bléomycine. En effet, le double mutant Aly-1 (*imp2Δ-gas1Δ*) est encore plus sensible que les simples mutants séparément. Ces résultats démontrent que les deux gènes, ne sont pas impliqués dans la même voie de signalisation en réponse à la bléomycine.

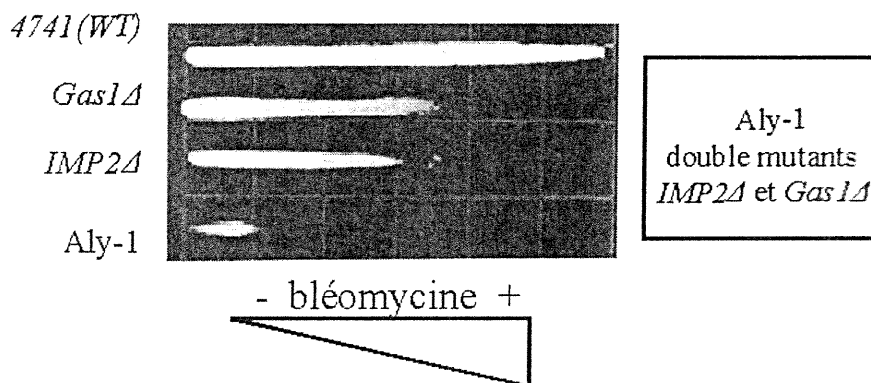


Figure16 : Pétri de gradient à la bléomycine comparant la sensibilité des mutants *imp2Δ*, *gas1Δ* et le double mutant Aly1 (*imp2Δ-gas1Δ*).

La souche By 4141 est la souche sauvage, les deux autres souches sont isogéniques de By 4741 dans laquelle on a délété respectivement le gène *gas1Δ* et *imp2Δ*. ALY-1 est aussi isogénique de By 4741 dans laquelle les deux gènes, *gas1Δ* et *imp2Δ* sont délétés simultanément.

3.10 Recherche de cibles transcriptionnelles pour Imp2 en réponse à la bléomycine.

Puisque Imp2 et Gas1 ne semble pas impliqué dans la même voie de signalisation. Nous nous sommes demandé quelles pourraient-être les cibles transcriptionnelles de la protéine Imp2. Par des essais de complémentation face à la bléomycine avec l'aide d'une librairie génomique, nous avons isolé un gène qui complète partiellement un mutant *imp2Δ* face à la bléomycine. Ce gène est l'activateur de transcription *YAPI*. (Coleman, 1999 ; Ramotar 1999 non publié) La figure17 nous démontre qu'une surexpression du gène *YAPI* complète partiellement un mutant *imp2Δ* face à la bléomycine.

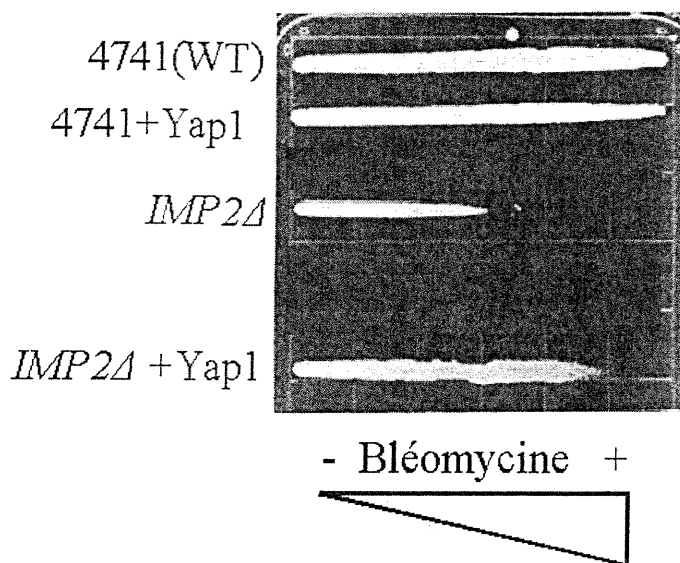


Figure17 : Pétri de gradient démontrant la complémentation d'un mutant *imp2Δ* par une surexpression du gène *YAPI* face à la bléomycine.

La souche By 4141 est la souche sauvage, dans la deuxième ligne, on voit la souche sauvage dans laquelle on a ajouté le plasmide pSey18-r*YAPI*. La troisième ligne représente la souche isogéniques de By 4741 dans laquelle on a délété le gène *imp2Δ*. Et la dernière souche est comme la précédente dans laquelle on a ajouté le plasmide pSey18-rYap1.

Aussi, afin de déterminer si Yap1 pouvait être impliqué dans la même voie de signalisation que Gas-1, nous avons voulu savoir si Yap1 complétait un mutant *gas1Δ*. Comme on peut le constater à la figure 18 A, une surexpression du gène *YAPI* ne complémente ni un mutant *gas1Δ*, ni le double mutant Aly1 face à la bléomycine. Ce dernier résultat indique que la présence du gène *gas1* est nécessaire combiné à la surexpression du gène *YAPI* pour complémente un mutant *imp2Δ* face à la bléomycine. De plus, à la figure 18 B on peut voir que le plasmid contenant le gène *GAS1* seul ne complémente pas un mutant *imp2Δ*, indiquant une fois de plus que la présence de Gas1 et Yap1 sont nécessaire conjointement pour complémente partiellement un mutant *imp2Δ*.

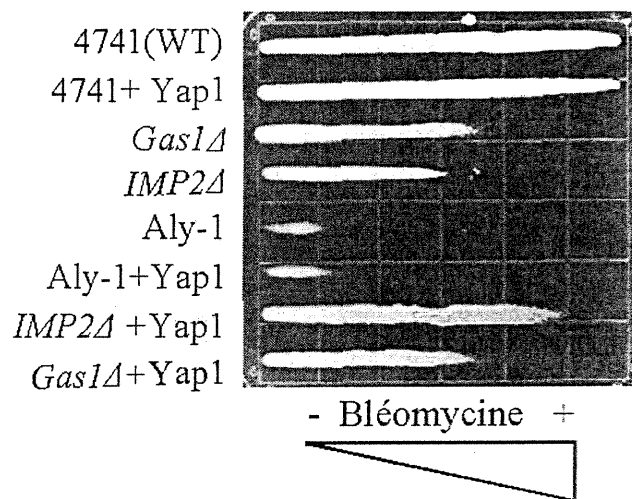


Figure 18A : Pétri de gradient démontrant la surexpression du gène *YAPI* dans un mutant *gas1Δ* et le double mutant Aly1 (*imp2Δ-gas1Δ*) face à la bléomycine.

La souche By 4141 est la souche sauvage, dans la deuxième ligne, on voit la souche sauvage dans laquelle on a ajouté le plasmide pSey18-rYap1. Les deux souches suivantes sont isogéniques de By 4741 dans laquelle on a délété respectivement le gène *gas1Δ* et *imp2Δ*. ALY-1 est aussi isogénique de By 4741 dans laquelle les deux gènes, *gas1Δ* et *imp2Δ* sont délétés simultanément. Les trois dernières souches sont isogéniques des trois précédentes dans lesquelles on a ajouté le plasmide pSey18-r*YAPI*.

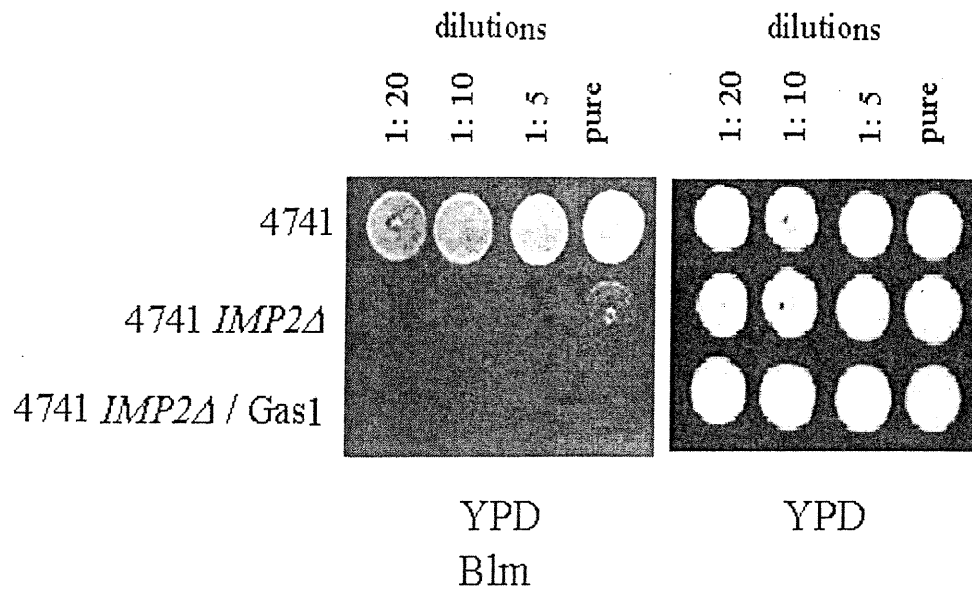


Figure 18B : Essais de dilution comparant *imp2Δ* et *imp2Δ*+*Gas1* face à la bléomycine.

La souche By 4141 est la souche sauvage, dans la deuxième ligne, on voit la souche isogénique de By 4741 dans laquelle on a délété gène *imp2Δ*. Et la dernière souche est comme la précédente dans laquelle on a ajouté le plasmide pYeplac195-*GAS1*.

Puisque la présence du gène *YAP1*, doit être combinée à celle du gène *GAS1* afin de compléter un mutant *imp2Δ*, face à la bléomycine, nous avons tenté de déterminer quel rôle Yap1 pourrait bien jouer au niveau de Gas1 pour rendre son

activité de complémentation efficace. Nous savons de plus que le gène *GAS1* semble posséder un élément de liaison à Yap1 dans sa région promotrice. Nous avons donc effectué des buvardages Northern utilisant une sonde pour Gas1 afin de connaître les variations possibles de l'expression génétique de *GAS1* en présence ou en absence de Yap1 et en présence ou absence de traitement à la bléomycine. Ainsi, sur la figure 19, on peut voir que l'expression de l'ARNm de *GAS1* ne varie pas dans les deux cas.

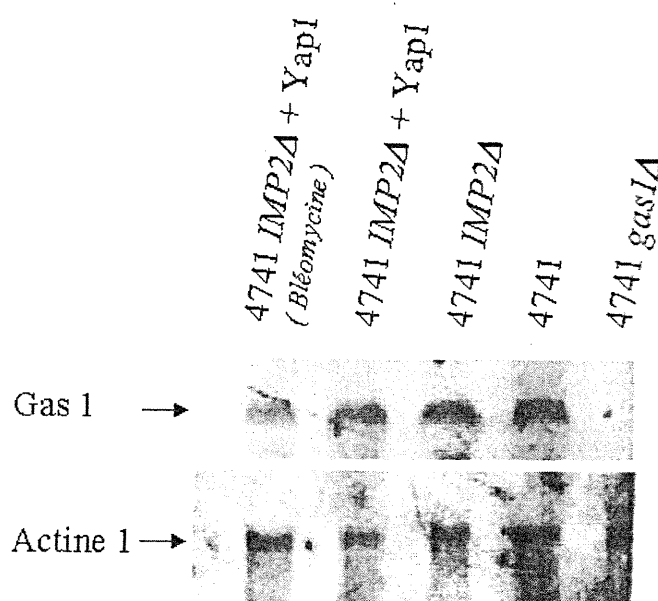


Figure19 : Buvardage northern représentant le niveau d'expression d'ARN du gène *GAS1* en présence ou absence de *YAPI* et/ou de bléomycine.

Les trois premières souches sont isogéniques de By 4741 dans laquelle on a délété le gène *imp2Δ*. Cependant, on a jouté le plasmide pSey18-*rYAPI* dans les deux premières souches (la première souche ayant été soumise à un traitement à la bléomycine et pas la seconde.) L'avant dernière souche, By 4141 est la souche sauvage, de chaque côté, on retrouve respectivement les souches isogéniques de By4741 dans laquelle on a délété un gène dans chaque souche *imp2Δ*, et *gas1Δ*.

IV. Discussion

Dans cet ouvrage, on retrouve une étude de la structure/fonction de la protéine Imp2. Imp2 est un activateur de transcription hypersensible à la bléomycine et autres oxydants et est aussi impliqué dans le maintien de l'homéostasie ionique. Comme certaines études le démontrent chez *YAP1*, nous avons investigué si Imp2 était régulé d'une façon rédox sensible. Une mutagenèse sur les cystéines contenues dans la protéine Imp2 démontre que celle-ci n'est pas régulée par le biais de ses cystéines en réponse à un stress oxydant salin ou thermique. De plus, puisque la bléomycine et autres oxydants peuvent endommager les parois cellulaires, nous avons analysé la possibilité d'une implication d'Imp2 au niveau de la paroi cellulaire.

4.1 La surexpression de la protéine Imp2 mutée dans chacune des cystéines séparément complémente un mutant *imp2Δ*

Afin d'étudier la structure/fonction de l'activateur de transcription *IMP2*, il était intéressant de comparer sa structure avec celle d'un autre activateur de transcription connu pour sa réponse face au stress oxydant : *YAP1*. Yap1p est régulée par la formation de ponts dissulfures entre deux cystéines conservées lors de stress oxydant. *IMP2* étant sensible aux oxydants, nous avons postulé qu'il soit régulé de façon similaire. La protéine Imp2 ne contient que 5 cystéines.

Afin de pouvoir faire des analyses sur le patron de migration de la protéine sur buvardage western de même que de pouvoir être en mesure d'identifier la localisation cellulaire de la protéine, nous avons utilisé un plasmide multicopie contenant le gène *IMP2* fusionné à la GFP. Ainsi, nous avons muté chacune des cystéines de Imp2 séparément (créations de 5 plasmides) et nous les avons comparés à la souche sauvage selon différents stress.

Les résultats de l'essai de dilution (figure9) démontrent qu'aucun des plasmides contenant le gène muté dans chaque cystéine séparément n'étaient sensible à la bléomycine ou autres oxydants. Ce qui indique que les cystéines ne joueraient aucun rôle dans la fonction antioxydante de Imp2. Cependant, il se peut qu'une des

cystéines touchées soit affectée à une autre fonction tel la protection contre le stress salin ou thermique. Ainsi, les mutants ont été testés pour leur résistance face au NaCl. Les résultats (non publié) démontrent qu'aucune cystéine n'est impliquée dans la fonction protectrice d'Imp2 contre des stress salins. De plus, l'analyse de la localisation cellulaire démontre que lors d'un choc thermique, chaque mutant répond de la même façon que la souche sauvage (agglomération cytoplasmique réversible)(tableauXI).

De plus, l'analyse sur buvardage western des protéines (sauvage et mutées) nous indique que le changement d'une cystéine pour une alanine ne semble pas empêcher la protéine de former un doublet (modification post-traductionnelle?).

Il est cependant possible que la surexpression de la protéine dans un plasmide multicopie ait pu masquer une légère perte de fonction attribuée aux mutations. Afin de vérifier, nous avons sous-cloné chacun des mutants dans un plasmide simple copie sous le contrôle du promoteur d'*IMP2*. Ici encore, les résultats d'un essai de dilution (figure11) démontrent que les cystéines mutées séparément n'affectent pas la fonction de la protéine. De plus, afin d'être plus précis, une courbe de survie comparant chaque mutant, et la protéine Imp2 sauvage face au peroxyde d'hydrogène et face à la bléomycine ont été effectuées. Le pourcentage de survie des mutants n'était pas significativement différent de celui de la protéine sauvage ce qui indique clairement que les cystéines, mutées séparément, ne sont pas impliquées dans la fonction antioxydante de la protéine Imp2.

4.2 Aucune combinaison de cystéines mutées n'a un effet sur la fonction de la protéine Imp2

La littérature nous a démontrée que certains activateurs de transcription tels *YAP1*, *PAP1*, *OXYR*, possèdent plusieurs cystéines et que dans certains cas, une double mutation est nécessaire à l'inactivation du gène (Yan et al., 1998). Ainsi, nous avons effectué des combinaisons de mutations sur les cystéines de la protéine Imp2 et analysé la réponse de chaque nouveau mutant face au stress oxydant, salin et thermique en comparaison avec la souche sauvage. Les résultats (tableauXII)

(sensiblement les mêmes expériences qu'avec les simples mutants) démontrent qu'aucune combinaison de mutations sur les cystéines entraîne l'inactivation de la protéine Imp2 face à chacun des stress mentionnés ci-haut.

4.3 Un anticorps anti-Imp2, un projet en cours.

Malgré que la protéine de fusion GFP n'altère généralement pas la fonction d'une protéine avec laquelle elle est fusionnée, il serait plus précis et pratique d'obtenir un anticorps spécifique dirigé contre Imp2 ce que nous tentons présentement d'obtenir. Une purification partielle de la protéine Gfp-Imp2 nous a permis d'isoler partiellement une seule des deux formes (doublet en simplet) de Imp2 (résultats non présentés). Grâce à cet anticorps, il nous sera possible d'affirmer avec plus de précision la localisation cellulaire de Imp2, de faire des études d'interaction protéiques et peut-être aussi d'identifier un homologue fonctionnel de Imp2 chez les mammifères.

4.4 Quels pourraient être les éléments structurels de la protéine Imp2 essentiels à sa fonction protectrice (contre le stress oxydant, salin ou thermique).

Puisque le model selon lequel Imp2 utiliserait ses cystéines pour exercer sa fonction antioxydante s'avère être inexacte, plusieurs autres models sont à vérifier.

4.4.1 Une activation par la phosphorylation ?

Selon l'article (Liu et al., 2000), une mutation de la sérine 230 à une alanine dans le gène *PHO2* peut abolir la capacité de la protéine Pho2 d'activer la transcription du gène *PHO5*. Cette réalité pourrait bien s'appliquer à Imp2.

En effet, la protéine Imp2 se retrouve dans la cellule sous la forme d'un doublet (Leduc et Hoflack non-publié) indiquant une possible modification post traductionnelle de la protéine susceptible d'être une phosphorylation. De plus, l'analyse de la séquence d'acide aminé de Imp2 révèle que cette protéine possède un domaine arginine/sérine (R/S). Ces domaines sont reconnus chez d'autres protéines pour être phosphorylés. Ainsi, en utilisant la méthode de mutagenèse dirigée, telle que démontrée pour les cystéines, nous serions en mesure de muter les sérines contenues dans ce domaine. Une inactivation de la protéine causée par une mutation dans une sérine serait une forte indication que la phosphorylation de Imp2 ou d'une autre protéine serait nécessaire à la fonction d'Imp2.

4.4.2 Imp2 est-elle ubiquitinée

Il a été démontré que Imp2 active la transcription de gènes lorsque la levure se voit contrainte d'utiliser d'autre source de glucose (Donnini et al., 1992). Ainsi, lors de la présence de glucose, il se peut qu'un mécanisme d'inactivation de la protéine Imp2 soit appliqué pour permettre l'utilisation du glucose. En effet, l'analyse du patron de migration de la protéine Imp2 sur buvardage western nous révèle la présence de bandes de plus hauts poids moléculaires indiquant une possible ubiquitination (Leduc et Fortier non publié). L'ubiquitination pourrait être nécessaire à la dégradation de la protéine ou à sa stabilisation (ségrégation) dans le but d'une utilisation ultérieure. Il serait intéressant de vérifier le patron de migration des protéines ayant subi un choc thermique, l'ubiquitination pourrait expliquer l'agglomération cytoplasmique de la protéine.

4.4.3 Une activation par une interaction protéine/protéine

Plusieurs évidences nous permettent de penser que la fonction de la protéine Imp2 pourrait se traduire par une interaction protéine/protéine. En effet, la protéine Imp2 possède un domaine riche en leucines à sa partie C-terminal. Ces domaines sont reconnus chez d'autres protéines pour être le site d'interaction entre protéines. Il est démontré dans un article que la bléomycine peut se lier à plusieurs sites sur la paroi cellulaire de même que sur certaines protéines (Lipke et al. 1993) (Gatignol et al., 1988). Imp2 pourrait bien lier une de ces protéines, peu d'études ont encore été faites à ce sujet. De plus, il a été démontré que la protéine Imp2 interagit avec Pat1 (Ito et al., 2001). Pat1 est une protéine impliquée dans le maintien de la paroi cellulaire, son rôle précis est encore inconnu, mais on sait qu'elle interagit avec les microtubules (Zheng et al., 1998).

4.5 Implication de la protéine Imp2 au niveau de la paroi cellulaire

Les mutants *imp2Δ* sont hypersensibles à la bléomycine. Il a été démontré que la bléomycine endommage la paroi cellulaire (Lipke et al., 1993), on peut donc se demander si Imp2 peut jouer un rôle au niveau de la paroi cellulaire ou des protéines impliquées à ce niveau.

4.5.1 Imp2 semble jouer un rôle au niveau de la paroi cellulaire

Le SDS est reconnu pour endommager la paroi cellulaire, le calcofluor white est aussi un agent déstabilisateur de la paroi et la caféine est toxique, mais n'entre dans la cellule que lorsqu'il y a un défaut dans la paroi cellulaire. La sensibilité à ses agents du mutant *gas1Δ* est caractéristique des mutants dont la paroi cellulaire est inadéquate. Les résultats démontrent qu'un mutant *imp2Δ* est lui aussi sensible à ces agents, mais à un degré moindre (Figure15). Ces résultats indiquent que Imp2 pourrait jouer un rôle au niveau de la paroi cellulaire.

Comme on peut le constater, à la figure16, le bon état de la paroi cellulaire est aussi requis pour la résistance à la bléomycine, *gas1Δ* et *imp2Δ* y étant sensible. Cependant, nous pouvons affirmer qu'Imp2 et Gas1 appartiennent à deux voies de signalisation différentes puisque le double mutant *imp2Δ gas1Δ* exhibe une sensibilité à la bléomycine beaucoup plus grande que chacun des mutants séparés. Ainsi, il est possible que Imp2 soit impliqué dans plus d'une voie de signalisation.

4.6 Recherche de cibles transcriptionnelles de Imp2 en réponse à la bléomycine

Afin de mieux caractériser l'implication de Imp2 en réponse à la bléomycine, nous avons tenter d'identifier des cibles transcriptionnelles potentielles de Imp2. Une complémentation d'un mutant *imp2Δ* face à la bléomycine à l'aide d'une librairie génomique nous a permis d'isoler le gène *YAPI*. Ainsi, une surexpression du gène *YAPI* procure à *imp2Δ*, un niveau de résistance à la bléomycine parental (figure 18). (la petite différence observée peut s'expliquer par la perte de plasmide (jusqu'à 80%)).

4.6.1 Quel pourrait être le mode d'action de Yap1?

Afin d'élucider le mode d'action de Yap1, nous avons voulu savoir si celui-ci pouvait compléter un mutant *gas1Δ*. Les résultats (figure17) démontrent qu'une surexpression de *YAP1* est incapable de compléter un mutant *gas1Δ* face à la bléomycine, mais peut très bien lui procurer une résistance plus élevée face au 4-NQO (non-publié). De plus, une surexpression de *YAP1* ne procure aucune résistance au double mutant *imp2Δ gas1Δ*, mais complète bien le simple mutant *imp2Δ*. Puisque la seule différence entre le double mutant et le simple mutant, est la présence ou non du gène *GAS1*, cela nous indique que Yap1 et Gas1 semblent nécessaire en combinaison pour procurer la résistance à la bléomycine d'un mutant *imp2Δ*. Cependant, la surexpression de *GAS1* seule dans un mutant *imp2Δ* ne lui reconferme aucune résistance à la bléomycine (figure18B) laissant croire que la protéine Gas1 ne dépend pas nécessairement de la présence de Yap1.

4.6.2 Gas1 nécessite-il la présence de Yap1 ?

Afin de déterminer quel pourrait être le lien fonctionnel entre Gas1 et Yap1, nous avons tenter de déterminer si Yap1 n'activerait pas la transcription de Gas1. L'analyse du promoteur de Gas1 nous indique la présence d'un élément de liaison à Yap1(ARE). Ainsi, nous avons analysé sur buvardage Northern, l'expression du message du gène *GAS1* en présence ou en absence de Yap1, en présence ou en absence de traitement à la bléomycine. Les résultats préliminaires (figure19) tendent à démontrer que Yap1 n'activerait pas la transcription de *GAS1*, même en présence de bléomycine. Cependant, la méthode utilisée peut ne pas être assez sensible et les expériences doivent être répétées. De plus, si ces résultats s'avèrent exacts, il n'est pas exclu que Yap1 soit nécessaire à des modifications post-traductionnelles de Gas1 pour son activation. De même que l'inverse pourrait être possible.

4.6.3 Yap1 nécessite-il la présence de Gas1 ?

Il semble que la présence de Gas1 soit nécessaire à la surexpression de Yap1 pour obtenir une complémentation d'un mutant *imp2Δ* face à la bléomycine. De plus, les résultats préliminaires indiquent que Yap1 ne semble pas influencer l'expression du message de *GAS1*. Ainsi, il est possible que Gas1 soit nécessaire à Yap1 pour son bon fonctionnement dans le contexte de complémentation d'un mutant *imp2Δ* face à la bléomycine. Cependant, des résultats non-présentés dans cet ouvrage démontrent qu'un mutant délété en *gas1Δ* n'est pas sensible au peroxyde d'hydrogène. De plus, même en absence de Gas1, une surexpression du gène *YAP1* est en mesure de procurer une résistance cellulaire au 4-NQO. Ces résultats indiquent que la protéine Yap1 est active même en absence de Gas1. Ainsi, il semble que les activités conjointes de Yap1 et Gas1 soient requises pour procurer une résistance cellulaire à un mutant *imp2Δ* en réponse à la bléomycine. Cependant, ces activités seraient distinctes et indépendantes de la présence de l'une ou l'autre de Gas1 ou Yap1.

V. Conclusion.

Le but de cette étude était d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de résistance cellulaire face à la bléomycine. La bléomycine est un agent antitumoral utilisé dans le traitement de certains cancers. Activée par la liaison simultanée de l'oxygène et du fer, la bléomycine attaque directement l'ADN et peut aussi endommager l'ARN et la paroi cellulaire. Les expériences passées nous ont permis d'identifier un gène de la levure *Saccharomyces cerevisiae* impliqué dans la résistance à la bléomycine. En effet, un mutant délété en *imp2Δ* est hypersensible à la bléomycine et à d'autres agents oxydants. *IMP2* est un activateur de transcription qui est aussi impliqué dans le maintien de l'homéostasie ionique.

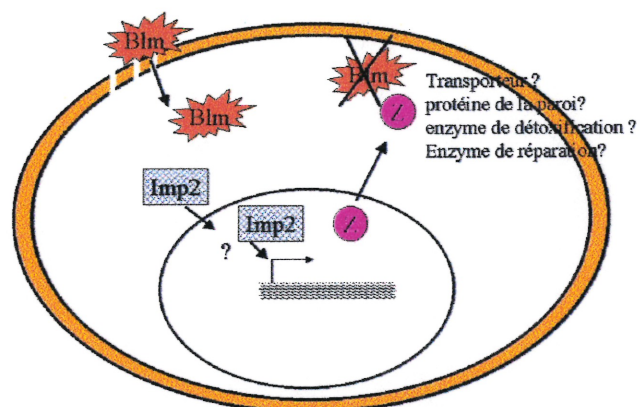
L'analyse de la structure/fonction du gène *IMP2* a révélée que malgré une structure homologue à l'activateur de transcription de *S. cerevisiae* *YAP1*, *IMP2* ne semble pas être régulé par le biais de ses cystéines.

Nous avons énuméré quelques modes de fonctionnement possibles d'Imp2 en relation avec sa structure. Il est possible que la protéine Imp2 soit phosphorylée puisqu'elle possède un domaine R/S et qu'elle se retrouve sous la forme d'un doublet dans la cellule. Une phosphorylation et l'analyse du patron de migration qui révèle la présence de bande de haut poids moléculaire, laissent suggérer une possible ubiquitination de la protéine. Finalement, la présence d'un domaine riche en leucine laisse suggérer que la protéine Imp2 pourrait être effective par une interaction protéine/protéine.

Pour terminer, la sensibilité comparable des mutants *gas1Δ* et *imp2Δ* nous indique qu'Imp2 pourrait jouer un rôle au niveau de la paroi cellulaire. La nécessité de la présence de Gas1 pour que la surexpression du gène *YAP1* arrive à compléter un mutant *imp2Δ*, nous amène à présenter le model suivant (figure 20).

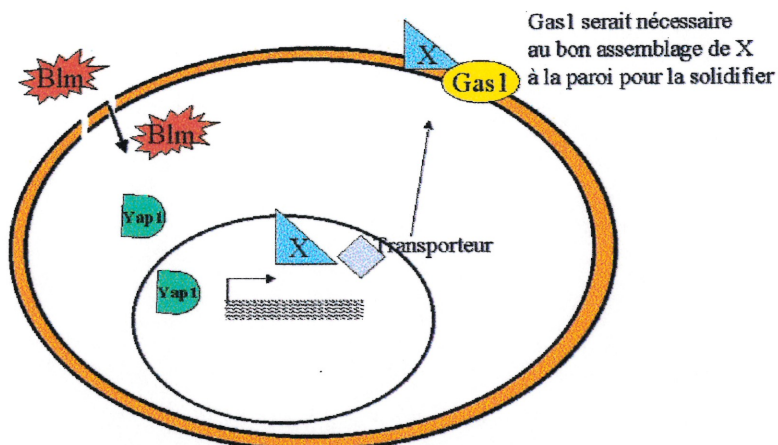
Il a été démontré que Gas1 est impliqué dans le maintien de l'organisation de la paroi cellulaire de la levure (Popolo et al., 1993). Certains articles indiquent aussi que le gène *YAP1* active constitutionnellement la transcription de plusieurs protéines de la paroi cellulaire Och1, Erv25, Plc1, Fas1, Cho1, Cwp2 etc (Dumond et al., 2000). Ainsi, si Imp2 joue un rôle au niveau de la paroi cellulaire et même si cela

n'est pas le cas, *YAPI* pourrait activer la transcription de gènes impliqués au niveau de la paroi cellulaire afin de compenser la perte de la fonction de *Imp2*. Possiblement de façon semblable à ce que l'on peut observer (une augmentation marquante de chitine) en réponse à une absence de *Gas1*.



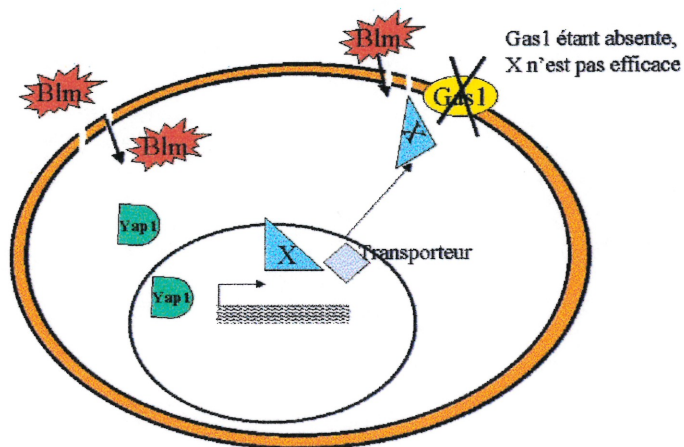
La bléomycine endommage la paroi cellulaire,
mais *IMP2* procure une résistance (rôle?)

A



En absence du gène *IMP2*, les cellules sont
hypersensibles à la blm.
La surexpression de Yap1 reconferme la résistance
uniquement en présence de Gas1.

B



En absence du gène *IMP2* et *GAS1*,
La surexpression de Yap1 est inefficace

C

Figure20 : Représentation schématique du modèle de complémentation d'un mutant *imp2Δ* par la présence de *GAS1* et *YAPI* en réponse à la bléomycine

En terminant, je voudrais mentionner que chacun des constituants cellulaires a son importance dans la survie de la cellule. Ces éléments interagissent tous de façon à protéger la cellule contre différents agresseurs. Cependant, ces mêmes mécanismes de défenses peuvent parfois être à l'origine de la mort cellulaire ou de cancers. Afin de tenter de guérir le cancer, les cellules sont soumises à plusieurs agents stressant auxquels elles répondent en devenant résistantes. La résistance aux traitements est un problème de plus en plus important et pour lequel il est important de consacrer les recherches.

Les membranes sont la première ligne de défense face à des agents exogènes, la caractérisation de celles-ci et de leur mode d'assemblage pourrait nous donner de nouvelles ressources afin de maîtriser la résistance cellulaire face à des agents traitant comme la bléomycine.

Références

- Alarco, A. M., Balan, I., Talibi, D., Mainville, N., and Raymond, M. (1997). AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J Biol Chem* 272, 19304-13.
- Arndt, D., Zeisig, R., Bechtel, D., and Fichtner, I. (2001). Liposomal bleomycin: increased therapeutic activity and decreased pulmonary toxicity in mice. *Drug Deliv* 8, 1-7.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajewski, E., and Dizdaroglu, M. (1989). Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem* 264, 20509-12.
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., and Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6161-5.
- Ausubel, F. M. e. R. B., et al.,. (1999). Short protocols in molecular biology, 4 th edition Edition, W. & Sons, ed.
- Bandyopadhyay, S., and Gronostajski, R. M. (1994). Identification of a conserved oxidation-sensitive cysteine residue in the NFI family of DNA-binding proteins. *J Biol Chem* 269, 29949-55.
- Barzilay, G., and Hickson, I. D. (1995). Structure and function of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Bioessays* 17, 713-9.
- Beaudouin, R., Lim, S. T., Steide, J. A., Powell, M., McKoy, J., Pramanik, A. J., Johnson, E., Moore, C. W., and Lipke, P. N. (1993). Bleomycin affects cell wall

anchorage of mannoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1264-9.

Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1620-4.

Benson, J. D., Benson, M., Howley, P. M., and Struhl, K. (1998). Association of distinct yeast Not2 functional domains with components of Gcn5 histone acetylase and Ccr4 transcriptional regulatory complexes. *Embo J* 17, 6714-22.

Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313-6.

Blakely, W. F., Fuciarelli, A. F., Wegher, B. J., and Dizdaroglu, M. (1990). Hydrogen peroxide-induced base damage in deoxyribonucleic acid. *Radiat Res* 121, 338-43.

Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J., and Cullen, B. R. (1996). Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* 16, 4207-14.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

Burger, R. M., Drlica, K., and Birdsall, B. (1994). The DNA cleavage pathway of iron bleomycin. Strand scission precedes deoxyribose 3-phosphate bond cleavage. *J Biol Chem* 269, 25978-85.

Burger, R. M., Peisach, J., and Horwitz, S. B. (1981). Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *J Biol Chem* 256, 11636-44.

Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., and Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 27393-8.

Calcutt, M. J., and Schmidt, F. J. (1994). Bleomycin biosynthesis: structure of the resistance genes of the producer organism. *Ann N Y Acad Sci* 721, 133-7.

Carnero, E., Ribas, J. C., Garcia, B., Duran, A., and Sanchez, Y. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* ehs1p is involved in maintaining cell wall integrity and in calcium uptake. *Mol Gen Genet* 264, 173-83.

Carter, B. J., de Vroom, E., Long, E. C., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., and Hecht, S. M. (1990). Site-specific cleavage of RNA by Fe(II).bleomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9373-7.

Coleman, S. T., Epping, E. A., Steggerda, S. M., and Moye-Rowley, W. S. (1999). Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Mol Cell Biol* 19, 8302-13.

Coleman, S. T., Tseng, E., and Moye-Rowley, W. S. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the ATR1 structural gene. *J Biol Chem* 272, 23224-30.

Costigan, C., Gehrung, S., and Snyder, M. (1992). A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol Cell Biol* 12, 1162-78.

de Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N., and Arino, J. (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7357-62.

Dean, R. T., Gieseg, S., and Davies, M. J. (1993). Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci* 18, 437-41.

Dedon, P. C., Plastaras, J. P., Rouzer, C. A., and Marnett, L. J. (1998). Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: formation of the pyrimidopurine adduct of deoxyguanosine by base propenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11113-6.

Demple, B., and Amabile-Cuevas, C. F. (1991). Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* 67, 837-9.

Demple, B., and Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63, 915-48.

Donnini, C., Lodi, T., Ferrero, I., and Puglisi, P. P. (1992). IMP2, a nuclear gene controlling the mitochondrial dependence of galactose, maltose and raffinose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 8, 83-93.

Dumond, H., Danielou, N., Pinto, M., and Bolotin-Fukuhara, M. (2000). A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H₂O₂-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast. *Mol Microbiol* 36, 830-45.

Elorza, M. V., Rico, H., and Sentandreu, R. (1983). Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol* 129, 1577-82.

Foury, F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* 195, 1-10.

Fox, T. D., Folley, L. S., Mulero, J. J., McMullin, T. W., Thorsness, P. E., Hedin, L. O., and Costanzo, M. C. (1991). Analysis and manipulation of yeast mitochondrial genes. *Methods Enzymol* 194, 149-65.

Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 893, 13-8.

Gatignol, A., Durand, H., and Tiraby, G. (1988). Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett* 230, 171-5.

Gershoni, J. M., and Palade, G. E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* 131, 1-15.

Gounalaki, N., and Thireos, G. (1994). Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. *Embo J* 13, 4036-41.

Gralla, E. B., Thiele, D. J., Silar, P., and Valentine, J. S. (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8558-62.

Grant, C. M. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol* 39, 533-41.

Gutteridge, J. M. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91, 133-40.

Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M., and Kitada, K. (1998). Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 258, 53-9.

Harrison, J. H., Jr., and Lazo, J. S. (1987). High dose continuous infusion of bleomycin in mice: a new model for drug-induced pulmonary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 243, 1185-94.

He, C. H., Masson, J. Y., and Ramotar, D. (1996). A *Saccharomyces cerevisiae* phleomycin-sensitive mutant, ph140, is defective in the RAD6 DNA repair gene. *Can J Microbiol* 42, 1263-6.

He, C. H., and Ramotar, D. (1999). An allele of the yeast RPB7 gene, encoding an essential subunit of RNA polymerase II, reduces cellular resistance to the antitumor drug bleomycin. *Biochem Cell Biol* 77, 375-82.

Hecht, S. M. (2000). Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *J Nat Prod* 63, 158-68.

Henle, E. S., and Linn, S. (1997). Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 272, 19095-8.

Hilbert, T. P., Chung, W., Boorstein, R. J., Cunningham, R. P., and Teebor, G. W. (1997). Cloning and expression of the cDNA encoding the human homologue of the DNA repair enzyme, *Escherichia coli* endonuclease III. *J Biol Chem* 272, 6733-40.

Hird, D. L., Worrall, D., Hodge, R., Smartt, S., Paul, W., and Scott, R. (1993). The anther-specific protein encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to beta-1,3-glucanases. *Plant J* 4, 1023-33.

Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., and Yodoi, J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3633-8.

Holmes, C. E., Duff, R. J., van der Marel, G. A., van Boom, J., and Hecht, S. M. (1997). On the chemistry of RNA degradation by Fe-bleomycin. *Bioorg Med Chem* 5, 1235-48.

Huang, R. P., and Adamson, E. D. (1993). Characterization of the DNA-binding properties of the early growth response-1 (Egr-1) transcription factor: evidence for modulation by a redox mechanism. *DNA Cell Biol* 12, 265-73.

Hutchinson, F. (1985). Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 32, 115-54.

Huttenhofer, A., Hudson, S., Noller, H. F., and Mascharak, P. K. (1992). Cleavage of tRNA by Fe(II)-bleomycin. *J Biol Chem* 267, 24471-5.

Igual, J. C., Johnson, A. L., and Johnston, L. H. (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *Embo J* 15, 5001-13.

Imlay, J. A., and Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302-9.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-8.

Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4569-74.

Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511-27.

Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H., and Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* 1426, 373-83.

Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 240-6.

Keszenman, D. J., Salvo, V. A., and Nunes, E. (1992). Effects of bleomycin on growth kinetics and survival of *Saccharomyces cerevisiae*: a model of repair pathways. *J Bacteriol* 174, 3125-32.

Kimura, T., Komiyama, T., Furuichi, Y., Iimura, Y., Karita, S., Sakka, K., and Ohmiya, K. (1999). N-glycosylation is involved in the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to HM-1 killer toxin secreted from *Hansenula mrakii* IFO 0895. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 176-84.

Komeili, A., and O'Shea, E. K. (1999). Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* 284, 977-80.

Kudo, N., Taoka, H., Toda, T., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999). A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1. *J Biol Chem* 274, 15151-8.

Kuge, S., Jones, N., and Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J* 16, 1710-20.

Kuge, S., Toda, T., Iizuka, N., and Nomoto, A. (1998). Crml (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells* 3, 521-32.

Lazo, J. S., Sebt, S. M., and Schellens, J. H. (1996). Bleomycin. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 16, 39-47.

Lehninger, A. L. (1975). *Biochemistry, The molecular Basis of cell structure and function*, Second edition Edition, J. H. u. s. o. medecine, ed. (New-York: Worth publisher inc.).

Levin, D. E., and Bartlett-Heubusch, E. (1992). Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J Cell Biol* 116, 1221-9.

Lim, S. T., Jue, C. K., Moore, C. W., and Lipke, P. N. (1995). Oxidative cell wall damage mediated by bleomycin-Fe(II) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177, 3534-9.

Lipke, P. N., and Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* 180, 3735-40.

Liu, C., Yang, Z., Yang, J., Xia, Z., and Ao, S. (2000). Regulation of the yeast transcriptional factor PHO2 activity by phosphorylation. *J Biol Chem* 275, 31972-8.

Lodi, T., Goffrini, P., Ferrero, I., and Donnini, C. (1995). IMP2, a gene involved in the expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 141, 2201-9.

Mages, G. J., Feldmann, H. M., and Winnacker, E. L. (1996). Involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* HDF1 gene in DNA double-strand break repair and recombination. *J Biol Chem* 271, 7910-5.

Marchler, G., Schuller, 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.

Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-70.

Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., and Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *Embo J* 15, 2227-35.

Masson, J. Y., and Ramotar, D. (1997). Normal processing of AP sites in *Apn1*-deficient *Saccharomyces cerevisiae* is restored by *Escherichia coli* genes expressing either exonuclease III or endonuclease III. *Mol Microbiol* 24, 711-21.

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. *Mol Cell Biol* 16, 2091-100.

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

Mir, L. M., Tounekti, O., and Orłowski, S. (1996). Bleomycin: revival of an old drug. *Gen Pharmacol* 27, 745-8.

Miyahara, K., Hirata, D., and Miyakawa, T. (1996). *yAP-1*- and *yAP-2*-mediated, heat shock-induced transcriptional activation of the multidrug resistance ABC transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 29, 103-5.

Moore, C. W. (1982). *cdc9* ligase-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* exhibit lowered resistance to lethal effects of bleomycin. *J Bacteriol* 151, 1617-20.

Moore, C. W. (1991). Further characterizations of bleomycin-sensitive (*blm*) mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with implications for a radiomimetic model. *J Bacteriol* 173, 3605-8.

Mrsa, V., and Tanner, W. (1999). Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* 15, 813-20.

Muller-Breitkreutz, K., Mohr, H., Briviba, K., and Sies, H. (1995). Inactivation of viruses by chemically and photochemically generated singlet molecular oxygen. *J Photochem Photobiol B* 30, 63-70.

Myrset, A. H., Bostad, A., Jamin, N., Lirsac, P. N., Toma, F., and Gabrielsen, O. S. (1993). DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. *Embo J* 12, 4625-33.

Naik, S. P., Samsonoff, W. A., and Ruck, R. E. (1988). Effects of surface-active agents on drug susceptibility levels and ultrastructure of *Mycobacterium avium* complex organisms isolated from AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 11, 11-9.

Neuhaus, O. M. J. a. W. O. (1982). *Human Biochemistry*, Tenth Edition, J. E. Lotz, ed. (St- Louis Missouri: Mostby).

Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A., and Riezman, H. (1991). Determinants for glycosphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 11, 27-37.

Poddevin, B., Orłowski, S., Belehraděk, J., Jr., and Mir, L. M. (1991). Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochem Pharmacol* 42, S67-75.

Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P., and Vai, M. (1997). Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179, 463-9.

Popolo, L., and Vai, M. (1999). The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim Biophys Acta* 1426, 385-400.

Popolo, L., Vai, M., Gatti, E., Porello, S., Bonfante, P., Balestrini, R., and Alberghina, L. (1993). Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation. *J Bacteriol* 175, 1879-85.

Porter, N. A., Caldwell, S. E., and Mills, K. A. (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30, 277-90.

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, 229-33.

Prieto-Alamo, M. J., Jurado, J., Gallardo-Madueno, R., Monje-Casas, F., Holmgren, A., and Pueyo, C. (2000). Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 275, 13398-405.

Pron, G., Belehradek, J., Jr., and Mir, L. M. (1993). Identification of a plasma membrane protein that specifically binds bleomycin. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 333-7.

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, 8010-5.

Rainwater, R., Parks, D., Anderson, M. E., Tegtmeyer, P., and Mann, K. (1995). Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol Cell Biol* 15, 3892-903.

Ramotar, D. (1997). The apurinic-apyrimidinic endonuclease IV family of DNA repair enzymes. *Biochem Cell Biol* 75, 327-36.

Ramotar, D., and Masson, J. Y. (1996). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant defines a new locus essential for resistance to the antitumour drug bleomycin. *Can J Microbiol* 42, 835-43.

Ramotar, D., Popoff, S. C., Gralla, E. B., and Demple, B. (1991). 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.

Reid, T. M., and Loeb, L. A. (1992). Mutagenic specificity of oxygen radicals produced by human leukemia cells. *Cancer Res* 52, 1082-6.

Richter, C. (1995). Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 27, 647-53.

Rossi, F., Labourier, E., Forne, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J. F., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C., and Tazi, J. (1996). Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* 381, 80-2.

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

Sausville, E. A., Stein, R. W., Peisach, J., and Horwitz, S. B. (1978). Properties and products of the degradation of DNA by bleomycin and iron(II). *Biochemistry* 17, 2746-54.

Schreck, R., Albermann, K., and Baeuerle, P. A. (1992). Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 17, 221-37.

Sebti, S. M., DeLeon, J. C., and Lazo, J. S. (1987). Purification, characterization, and amino acid composition of rabbit pulmonary bleomycin hydrolase. *Biochemistry* 26, 4213-9.

Sherman, F., G. R., et Hicks, J. (1983). *Methods in yeast genetics.*, Press editor Edition, e. C.H.S.L. Press, ed. (New-york: Cold Spring Harbor).

Stadtman, E. R. (1990). Covalent modification reactions are marking steps in protein turnover. *Biochemistry* 29, 6323-31.

Steels, E. L., Learmonth, R. P., and Watson, K. (1994). Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology* 140, 569-76.

Stryer, L. (1988). *Biochemistry*, Third edition Edition, W. H. F. a. company, ed. (New York: Library of congress Cataloging-in-Publication Data).

Sugiyama, M., Kumagai, T., Shionoya, M., Kimura, E., and Davies, J. E. (1994). Inactivation of bleomycin by an N-acetyltransferase in the bleomycin-producing strain *Streptomyces verticillus*. *FEMS Microbiol Lett* 121, 81-5.

Takao, M., Aburatani, H., Kobayashi, K., and Yasui, A. (1998). Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 26, 2917-22.

Tamarit, J., Cabiscol, E., and Ros, J. (1998). Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem* 273, 3027-32.

Thevelein, J. M., and de Winde, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33, 904-18.

Thyagarajan, B., Padua, R. A., and Campbell, C. (1996). Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *J Biol Chem* 271, 27536-43.

Tibbles, L. A., and Woodgett, J. R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 55, 1230-54.

Tomkinson, A. E., Bonk, R. T., and Linn, S. (1988). Mitochondrial endonuclease activities specific for apurinic/apyrimidinic sites in DNA from mouse cells. *J Biol Chem* 263, 12532-7.

Toone, W. M., and Jones, N. (1999). AP-1 transcription factors in yeast. *Curr Opin Genet Dev* 9, 55-61.

Toone, W. M., Morgan, B. A., and Jones, N. (2001). Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* 20, 2336-46.

Tukmachev, V. A., Nedospasova, L. V., Zaslavskii, B., and Rogozhin, S. V. (1979). [Effect of sodium dodecyl sulfate on biological membranes]. *Biofizika* 24, 55-60.

Turchini, A., Ferrario, L., and Popolo, L. (2000). Increase of external osmolarity reduces morphogenetic defects and accumulation of chitin in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 182, 1167-71.

Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., and Okami, Y. (1966). New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)* 19, 200-9.

Valentin, E., Herrero, E., and Sentandreu, R. (1986). Incorporation of mannoproteins into the walls of aculeacin A-treated yeast cells. *Arch Microbiol* 146, 214-20.

Vance, J. R., and Wilson, T. E. (2001). Repair of DNA strand breaks by the overlapping functions of lesion-specific and non-lesion-specific DNA 3' phosphatases. *Mol Cell Biol* 21, 7191-8.

Ward, J. F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35, 95-125.

Wemmie, J. A., Szczypka, M. S., Thiele, D. J., and Moye-Rowley, W. S. (1994). Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *J Biol Chem* 269, 32592-7.

Wendler, F., Bergler, H., Prutej, K., Jungwirth, H., Zisser, G., Kuchler, K., and Hogenauer, G. (1997). Diazaborine resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals a link between YAP1 and the pleiotropic drug resistance genes PDR1 and PDR3. *J Biol Chem* 272, 27091-8.

Worth, L., Jr., Frank, B. L., Christner, D. F., Absalon, M. J., Stubbe, J., and Kozarich, J. W. (1993). Isotope effects on the cleavage of DNA by bleomycin: mechanism and modulation. *Biochemistry* 32, 2601-9.

Wu, X., Bishopric, N. H., Discher, D. J., Murphy, B. J., and Webster, K. A. (1996). Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change. *Mol Cell Biol* 16, 1035-46.

Xu, H. E., and Johnston, S. A. (1994). Yeast bleomycin hydrolase is a DNA-binding cysteine protease. Identification, purification, biochemical characterization. *J Biol Chem* 269, 21177-83.

Yan, C., Lee, L. H., and Davis, L. I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *Embo J* 17, 7416-29.

Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279, 1718-21.

Zorov, D. B. (1996). Mitochondrial damage as a source of diseases and aging: a strategy of how to fight these. *Biochim Biophys Acta* 1275, 10-5.