

2m11.2713.6

Université de Montréal

**Synthèse translésion sur une matrice contenant un dimère  
de thymine par un extrait cellulaire CHO**

par

Luc Marchand

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

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

Juillet 98

©Luc Marchand, 1998



Q.H. 111111

506

UB4

1999

V.015

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY

1999

1999

1999

1999

1999

1999

1999

1999



1999

1999

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Synthèse translésion sur une matrice contenant un dimère  
de thymine par un extrait cellulaire CHO**

Présenté par:

Luc Marchand

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président rapporteur: Elliot Drobetsky

Directeur de recherche: Daniel Svoboda

Membre du jury: Dindial Ramotar

Mémoire accepté le: \_\_\_\_\_ 1998

## Sommaire

Il arrive que la réplication de l'ADN commence et que les mécanismes de réparation n'aient pas enlevé la totalité des dommages. Dans la majorité des cas, la polymérase se trouve bloquée lorsqu'elle rencontre un dommage. Cependant, il existe des mécanismes de tolérance face aux dommages permettant la reprise de la réplication mais en conservant le dommage dans l'ADN. Deux modèles cellulaires peuvent nous aider à étudier le phénomène de tolérance aux dommages chez les mammifères: les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) et les cellules XPV (Xeroderma Pigmentosum Variant). Les cellules CHO n'ont presque pas d'activité de réparation de dommage mais possèdent des mécanismes très efficaces de tolérance face aux dommages. Pour leur part, les cellules XPV sont déficientes dans au moins un des mécanismes de tolérance aux dommages. Nous avons développé une méthode utilisant des extraits cellulaires, qui nous permet d'étudier les mécanismes de tolérance aux dommages. À l'aide de cette méthode, nous avons démontré que les extraits cellulaires de CHO complètent le manque d'activité de tolérance aux dommages de XPV. Nous avons donc commencé à purifier la (les) composante(s) de CHO qui complémente(nt) XPV. Pour l'instant, une seule étape de purification (colonne de phosphocellulose P-11) éliminant 75% des protéines fonctionne de manière fiable. Comme deuxième étape de purification nous avons démontré qu'une colonne phénylsépharose n'est pas un bon choix. Les bases sont jetées afin de pouvoir purifier une des composantes responsable de l'activité de tolérance face aux dommages chez les mammifères.

## Table des matières

INTRODUCTION .....	1
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	18
Matériel.....	18
Préparation de la matrice .....	18
Préparation de l'étalon interne.....	20
Essai de réplication .....	21
Digestion par les enzymes de restriction.....	21
Normalisation.....	22
Gel d'agarose .....	23
Colonne de phosphocellulose P-11 .....	23
Colonne de phénylsépharose.....	23
RÉSULTATS.....	26
DISCUSSION.....	42
RÉFÉRENCES .....	47

Liste des tableaux

Tableau I: <b>Lignées cellulaires utilisées lors de mon projet</b> .....	28
Tableau II: <b>Restauration de la réplication <i>in vitro</i> de l'extrait cellulaire</b> .....	30
Tableau III: <b>Correspondance entre l'incorporation de <sup>32</sup>P et la proportion</b> .....	32
Tableau IV: <b>Activité inhibitrice de l'extrait cellulaire CHO-UV-1</b> .....	36

Liste des figures

Figure 1: Mécanisme de recombinaison chez <i>Escherichia coli</i> .....	2
Figure 2: Mécanisme de commutation de matrice (template switching).....	4
Figure 3: Voies de réparation post-réplicationnelle.....	6
Figure 4: Modifications apportées au plasmide pBluescript II KS.....	19
Figure 5: Construction de la matrice endommagée .....	25
Figure 6: Exemple de gel obtenu et interprétation des résultats.....	27
Figure 7: Complémentation de XPV par l'extrait cellulaire de CHO .....	31
Figure 8: Complémentation de XPV par l'extrait cellulaire de CHO-UV-1.....	34
Figure 9: Complémentation de XPV par des quantités plus petite d'extrait .....	35
Figure 10: Activité des fractions de la colonne phosphocellulose P-11.....	37
Figure 11: Activité des fractions provenant de la colonne phénylsépharose .....	39
Figure 12: Activité des fractions P1 et P2 combinées.....	40
Figure 13: Effet de la dialyse sur l'activité de la fraction CFII .....	41

Listes des sigles et abréviations

$\alpha$ :	Alpha
AAF:	Acétylaminofluorène
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ATP:	Adénosine triphosphate
BND:	Benzoylated Naphtoylated DEAE
BrdUrd:	Bromodésoxyuridine
CHO:	Ovaire d'hamster chinois (Chinese hamster ovary)
$\delta$ :	Delta
dATP:	Désoxyadénosine triphosphate
dCMP:	Désoxycytosine monophosphate
dCTP:	Désoxycytosine triphosphate
dGTP:	Désoxyguanosine triphosphate
dNTP:	Désoxynucléotides triphosphate
DTT:	Dithiotréitol
dTTP:	Désoxythymidine triphosphate
GTP:	Guanosine triphosphate
Py:	Polyome
RPR:	Réparation post-réplicationnelle
SDS:	Sodium dodécyl sulfate
SV40:	Virus simien 40
TE:	Tris-EDTA
TTP:	Thymidine triphosphate
UTP:	Uracile triphosphate
UV:	Ultraviolets
XP:	Xeroderma pigmentosum
XPV:	Xeroderma pigmentosum variant
$\zeta$ :	Zêta



## INTRODUCTION

L'ADN est la structure fondamentale de tous les êtres vivants. Il constitue l'ensemble des gènes qui encodent toutes les protéines dont chaque cellule a besoin pour ses diverses fonctions. Il est capital pour la santé des cellules que l'ADN conserve son intégrité et sa fonctionnalité. Toutefois, l'ADN est constamment attaqué par différents agents qui l'endommagent (rayonnements ionisants, lumière ultraviolette, substances chimiques, radicaux libres, etc.) (8, 11, 26, 31, 49, 55, 61). Lorsqu'elle tente de répliquer de l'ADN endommagé, la polymérase doit se servir de l'information provenant de bases modifiées (au niveau des liaisons hydrogène et de l'empilement des paires de bases) qui ne correspond pas à celle des bases usuelles (26, 68). Souvent, la polymérase bloque au niveau de la lésion (14, 34, 53, 60); mais elle peut parfois continuer la réplication et insérer une base face à la lésion. Lorsque la base insérée n'est pas la bonne, il y a mutation. Ces mutations sont souvent localisées dans une région non codante de l'ADN et n'ont alors aucune conséquence pour l'organisme. Toutefois, lorsque la mutation affecte un gène important, comme un gène suppresseur de tumeur (p. ex. p53), il peut y avoir immortalisation de la cellule et risque de cancer (91, 92). Divers organismes ont, au cours de leur évolution, élaboré des mécanismes leur permettant de réparer les lésions avant la réplication. Les deux principaux mécanismes connus de réparation de l'ADN sont la réparation par excision de nucléotides et la réparation par excision de bases (24). Lorsque les mécanismes de réparation ne fonctionnent pas adéquatement ou que les lésions sont trop abondantes pour que les mécanismes puissent éliminer toutes les lésions avant la réplication, un autre mécanisme issu du processus de l'évolution peut intervenir: la réparation post-répliationnelle (RPR) (32, 34, 36). Il ne s'agit pas en fait d'un mécanisme de réparation, mais plutôt d'un mode de tolérance qui permet à la réplication de se poursuivre sans enlever la lésion du génome (24). À l'heure actuelle, on possède peu de

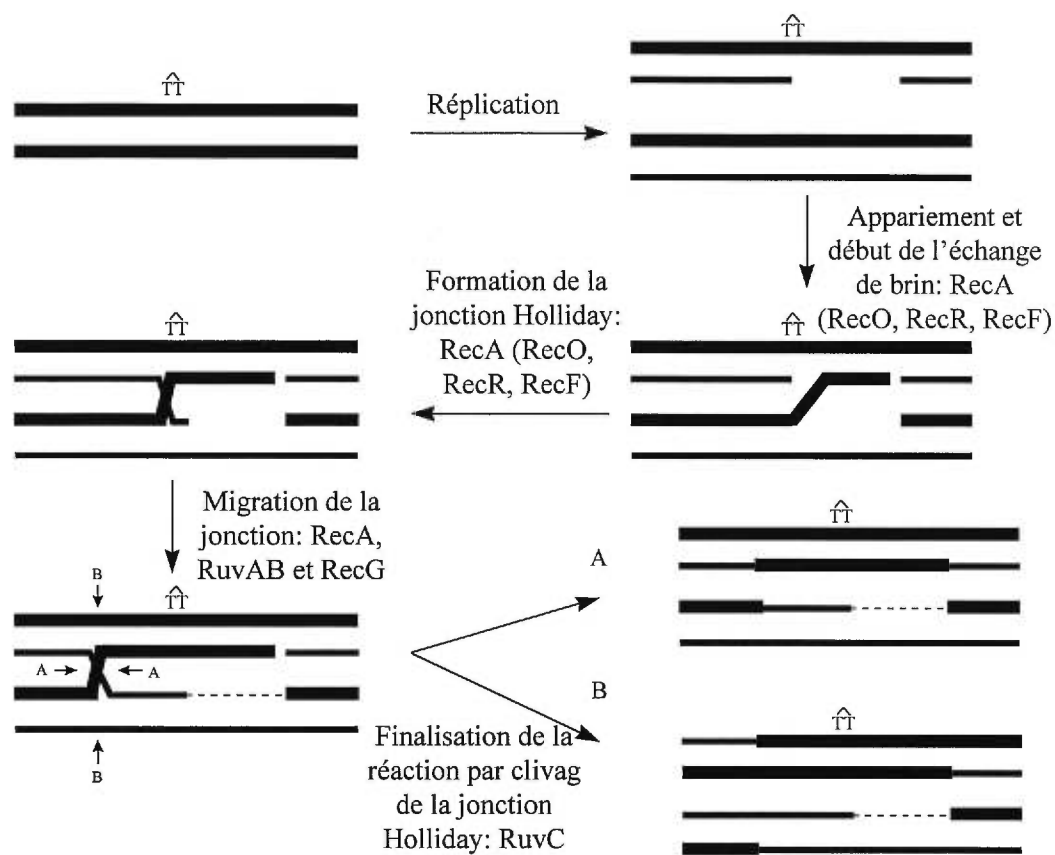


Figure 1: **Mécanisme de recombinaison chez *Escherichia coli***

Pour ce processus, RecA se lie et polymérise sur l'ADN simple brin pour former un filament nucléoprotéinique. Ce filament est ensuite capable d'interagir avec de l'ADN double brin via un second site de liaison et rechercher une séquence homologue. Quand les 2 molécules sont proprement enlignées, l'échange de brin s'effectue et il y a formation d'une jonction Holliday. Ce dernier processus est aidé par plusieurs protéines accessoires: SSB, RecO, RecR et possiblement RecF. Lorsque la jonction Holliday est bien établie, RecA avec l'aide de RuvA et RuvB stimule la migration de la fourche passé la séquence de la lésion. La protéine RecG joue peut-être un rôle similaire à RuvAB mais sa fonction n'est pas bien définie. Finalement, la protéine RuvC coupe la jonction Holliday et laisse 2 molécules d'ADN double brin intactes.

données sur les mécanismes intervenant dans le processus de RPR, mais on en connaît deux voies principales : l'évitement des lésions et la synthèse translésion ( ou bypass).

Les mécanismes d'évitement des lésions reposent en fait sur l'utilisation de l'information de la séquence complémentaire non endommagée pour contourner la lésion. Le premier mécanisme d'évitement des lésions est la recombinaison de la région touchée par la lésion de manière à assurer une duplication sans erreur de l'information (71, 95, 96). Pour ce processus, RecA se lie et polymérise sur l'ADN simple brin pour former un filament nucléoprotéinique (21, 22). Ce filament est ensuite capable d'interagir avec de l'ADN double brin via un second site de liaison et rechercher une séquence homologue (35, 66, 69, 80). Quand les 2 molécules sont proprement alignées, l'échange de brin s'effectue et il y a formation d'une jonction Holliday (97). Ce dernier processus est aidé par l'action de protéines accessoires: SSB, RecO, RecR et possiblement RecF (17, 90). Lorsque la jonction Holliday est bien établie, RecA avec l'aide de RuvA et RuvB stimulent la migration de la fourche au travers de la séquence de la lésion (63, 64, 69, 89). La protéine RecG joue peut-être un rôle similaire à RuvAB mais sa fonction n'est pas bien définie (47, 48). Finalement, la protéine RuvC coupe la jonction Holliday et laisse 2 molécules d'ADN double brin intactes (voir la figure 1 à la page 2) (7, 15, 19). Le deuxième mécanisme d'évitement est la commutation de matrice (template switching) (20, 28). Ce processus, également sans erreur, utilise le nouveau brin synthétisé à partir de la séquence complémentaire non endommagée. Arrivée au niveau de la lésion, la polymérase migre vers le nouveau brin synthétisé et le copie jusqu'à ce qu'il ait passé la séquence de la lésion. La polymérase peut ensuite revenir au brin endommagé et continuer la réplication (voir la figure 2 à la page 4).

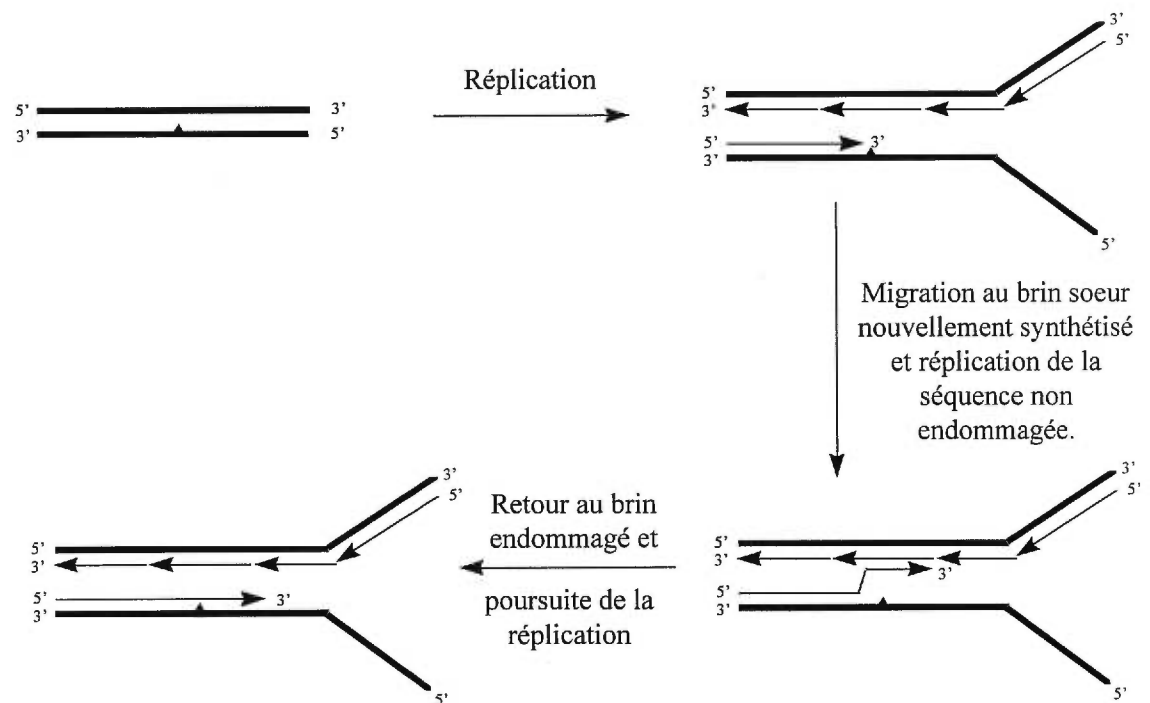


Figure 2: **Mécanisme de commutation de matrice (template switching)**

Ce processus utilise le nouveau brin synthétisé à partir de la séquence complémentaire non endommagée. Arrivée au niveau de la lésion, la polymérase migre vers le nouveau brin synthétisé et le copie jusqu'à ce qu'il ait passé la séquence de la lésion. La polymérase peut ensuite revenir au brin endommagé et continuer la répllication.

Le mécanisme de synthèse translésion se traduit par l'insertion d'un nucléotide en face de la lésion puis par la reprise de la synthèse (58, 60). Cela peut se produire après une brève pause ou un arrêt de la polymérase au site de la lésion, suivi de la reprise de la réplication en aval de la lésion et comblement de la brèche par la même polymérase (delta ou epsilon) ou par une polymérase plus spécialisée (p. ex la polymérase zêta décrite ci-après). Ce mécanisme, qui peut comporter des erreurs ou non, est probablement le mécanisme par lequel la plus grande majorité (si ce n'est pas toute) la mutagenèse induite provient (5, 24, 34, 58, 77). On a émis l'hypothèse que le mécanisme de synthèse translésion pourrait procéder par deux voies différentes, l'une avec erreur et l'autre sans erreur. Cette hypothèse résulte de l'observation que la mutation des gènes intervenant dans le mécanisme de synthèse translésion ont un impact sur la mutagenèse induite (37-39, 41, 51, 52). Les gènes mutés qui réduisent la mutagenèse induite sont considérés comme provenant de la voie comportant des erreurs. Les autres gènes intervenant dans le mécanisme de synthèse translésion qui ne réduisent pas ou même augmentent la mutagenèse induite sont considérés comme provenant de la voie sans erreur. Néanmoins, il reste à prouver que le mécanisme de synthèse translésion est réellement constitué de deux voies différentes chez les eucaryotes. La figure 3 (page 6) présente les voies de réparation post-réplicationnelle et leur importance relative (voir plus loin) dans le phénomène.

Les mécanismes associés à la tolérance des lésions varient en fonction de plusieurs facteurs, notamment le type d'organisme, la séquence dans laquelle est située la lésion et le type de lésion. Par exemple, les dimères de pyrimidine provoquent principalement des substitutions de bases (4, 26) alors que les adduits N-2-acétylamino-fluorène (AAF) provoquent des changements de cadre de lecture -1 et -2 (6, 33, 54, 86). En outre, la synthèse translésion des AAF est grandement influencée par la séquence dans laquelle elle est située. Par contre,

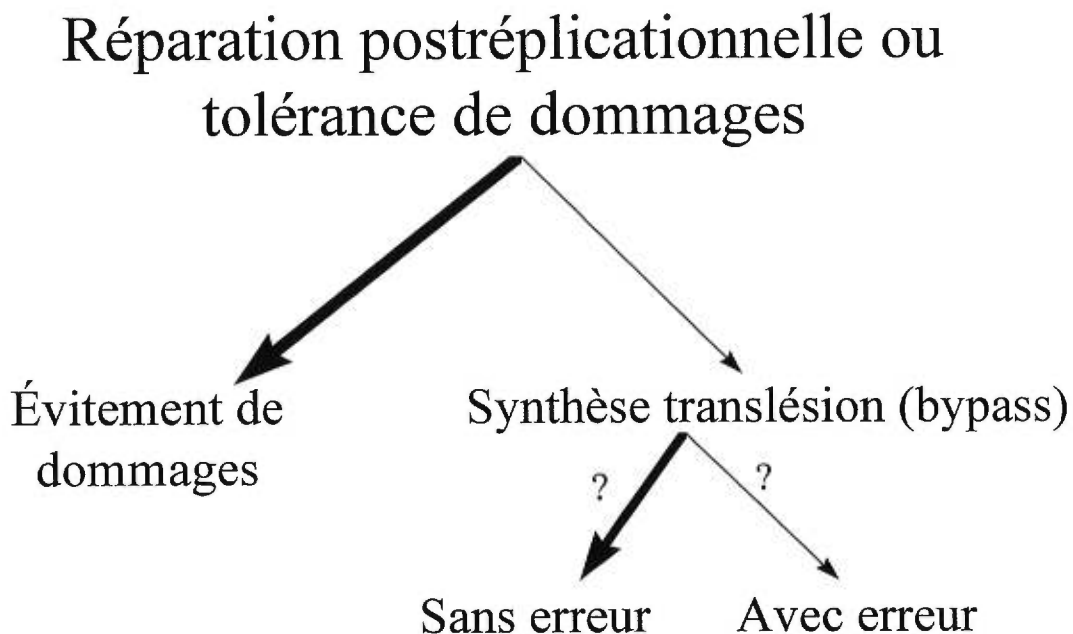


Figure 3: **Voies de réparation post-réplicationnelle**

Les voies de réparation post-réplicationnelle et leur importance relative dans le phénomène. Les mécanismes sans erreur semblent favorisés dans la plupart des cas. Par exemple, lors de la RPR des AAF chez *E. coli* et *S. cerevisiae*, il a été observé que l'évitement des lésions est utilisé dans à peu près 90 % des cas, la synthèse translésion sans erreur dans 7 à 10 % des cas et enfin la synthèse translésion avec erreur dans 0,3 à 2,0 % des cas.

le synthèse translésion des dimères de pyrimidine est dans la plupart des cas indépendante de la séquence. Par ailleurs, les mécanismes sans erreur semblent favorisés dans la plupart des cas. Dans le cas de la RPR des AAF chez *E. coli* et *S. cerevisiae*, nous avons observé que l'évitement des lésions est utilisé dans à peu près 90 % des cas, la synthèse translésion sans erreur dans 7 à 10 % des cas et enfin la synthèse translésion avec erreur dans 0,3 à 2,0 % des cas (5, 34).

Chez *E. coli*, il a été démontré que la recombinaison (évitement des lésions) est la principale voie de RPR (71). On a également observé une voie moins caractérisée, laquelle est mutagénique et repose sur la présence des protéines Pol III, RecA activée (RecA\*), UmuD et UmuC (67). La protéine RecA\* est active dans d'autres mécanismes, telle la recombinaison (65); dans la RPR, elle agit en coupant la protéine UmuD (10, 75). La protéine UmuD coupée (appelée UmuD') peut alors former des dimères avec d'autres protéines telle qu'UmuC (99) et causer la mutagenèse. On a montré que l'opéron UmuDC est suffisant et nécessaire pour contourner les dimères de pyrimidine (77). L'action des protéines UmuD et UmuC n'ont été observées que dans la voie de RPR; on a émis l'hypothèse que le complexe UmuD'C agit au niveau de l'une des sous-unités de la polymérase III (9, 84). Comme on l'a déjà mentionné, les mécanismes de synthèse translésion varient selon le type de lésion. Lorsque la lésion est un AAF, il y a de la synthèse translésion avec erreur et sans erreur. La voie sans erreur est stimulée par UmuDC, alors que la voie avec erreur ne dépend pas d'UmuDC mais d'un autre facteur inductible par SOS (50, 58). Ces résultats peuvent au premier abord sembler en contradiction avec des résultats précédents, mais une analyse plus approfondie nous révèle qu'au contraire ils concordent. Si le dommage code toujours, mais plus de manière aussi stricte (différente accessibilité à des liens hydrogènes peut changer l'affinité du site pour les différents nucléotides) comme dans le cas des dimères de pyrimidine, UmuDC est nécessaire pour qu'il y ait synthèse

translésion. Si la mutation doit résulter d'un glissement de la matrice ("template"), UmuDC n'est pas utilisée et il faut un autre facteur pour effectuer la synthèse translésion.

Chez *S. cerevisiae*, c'est le groupe épistatique RAD6 qui est responsable des fonctions de RPR (36). Les gènes appartenant à ce groupe ont été réunis à cause de leur sensibilité à différents agents endommageant. Lorsque la présence de mutations à deux locus génétiques différents confère un phénotype (comme la sensibilité au rayonnement UV) quantitativement identique à celui conféré par chacune des mutations isolées, les deux gènes sont qualifiés d'épistatiques l'un par rapport à l'autre. En effet, les deux gènes peuvent intervenir dans une même voie comportant plusieurs étapes ou ils peuvent encoder des éléments différents d'un même complexe multiprotéique (23). Lorsqu'un double mutant est plus sensible à un agent endommageant donné que chacun des mutants isolés, les gènes concernés interviennent donc dans deux voies distinctes. Le groupe épistatique RAD6 renferme beaucoup de gènes, dont les suivants sont les mieux connus : RAD6, RAD18, REV3, REV7, REV1, RAD5, RAD9, CDC7 et CDC8 (36). Dans ce groupe, seules quelques fonctions directes ont été attribuées à des gènes spécifiques.

Les protéines issues des gènes RAD6 et RAD18 forment un complexe possédant les activités ubiquitine-conjugase et ATPase ADN-dépendante. Ce complexe peut également se lier à l'ADN simple brin (3). Toutes les fonctions de la protéine issue du gène RAD6 proviennent de son activité d'ubiquitination. En fait, la souche chez laquelle le résidu cystéine responsable du transfert de l'ubiquitine (Cys-88) est remplacé par un résidu sérine qui accepte l'ubiquitine, mais est incapable d'en faire le transfert à une autre protéine, se comporte comme si elle était RAD6-déficiente (81).



Les protéines issues des gènes REV3 et REV7 forment la polymérase  $\zeta$  (zêta) (40). Cette polymérase n'est pas essentielle à la réplication normale et n'est pas régulée par le cycle cellulaire (76). Fait intéressant à signaler, sur une matrice avec amorce renfermant un dimère cis-syn cyclobutane, la polymérase  $\zeta$  est capable d'insérer un nucléotide en face de la lésion et peut poursuivre l'élongation en aval de la lésion (synthèse translésion) dans environ 10 % des cas (60). Il s'agit du processus le plus efficace observé jusqu'à maintenant dans des conditions non contraignantes (temps d'incubation court et faible quantité d'enzyme) (60). D'autres caractéristiques font de la polymérase  $\zeta$  une bonne candidate comme enzyme de réplication des lésions : elle ne possède pas d'activité exonucléase 3'-5' et elle peut efficacement faire l'élongation d'une amorce présentant un mésappariement en 3' (60). En outre, le groupe de Fuchs a montré à l'aide d'adduits AAF que la protéine REV3 est nécessaire dans tous les processus de synthèse translésion (5).

La protéine issue du gène REV1 possède une activité désoxycitydyl-transférase. Elle peut insérer un C en face d'un site abasique *in vitro* dans 30 à 40 % des cas (59). De plus, la protéine REV1 doit avoir des fonctions autres que son activité désoxycitydyl-transférase, étant donné qu'elle est requise pour des processus mutagénique où n'intervient pas l'insertion de dCMP.

La séquence du gène RAD5 permet de prédire une activité hélicase (30). La protéine issue de ce gène intervient dans une voie sans erreur et pourrait participer à un mécanisme semblable à celui de la commutation de matrice. D'autres protéines issues de gènes comme RAD9, CDC7 et CDC8 appartenant au groupe épistatique RAD6, ont été clonées, mais leurs fonctions ne sont pas encore établies, bien qu'on puisse prédire certaines d'entre elles d'après leurs séquences.

Certaines protéines intervenant dans la réplication de l'ADN interviennent également dans la RPR. Prakash et coll. ont montré que l'antigène nucléaire des cellules prolifératives (PCNA) et la polymérase  $\delta$  (delta) interviennent dans la voie sans erreur de RPR (87, 88). On peut établir le modèle suivant à partir des données précédentes : 1) la polymérase delta (et/ou epsilon) est bloquée au niveau d'une lésion, 2) le complexe RAD6-RAD18 se fixe au complexe de réplication arrêté et l'ubiquitinase agit sur certaines protéines, 3) la dégradation ciblée de certaines protéines ou de toutes les protéines du complexe de réplication normal permet aux protéines de la RPR d'intervenir dans le cadre d'une voie avec ou sans erreur, 4) le choix de la voie utilisée varie selon la lésion, le contexte de séquence, etc. Plusieurs groupes ont étudié les mutations induites par le rayonnement UV chez les mutants RAD6, REV1 et REV3 (37-39, 41, 51, 52). Ces chercheurs ont montré que les gènes RAD6 et REV3 sont requis pour la production de plus de 98 % des mutations de substitution. La fonction REV1 était nécessaire dans environ 95 % des mutations de substitution. Dans le cas des changements de cadre de lecture, toutefois, la participation du REV3 variait entre 85 et 99 % des cas selon le test utilisé. La majorité des changements de cadre de lecture sont également indépendants de REV1.

Chez les cellules de mammifère, on a étudié la RPR à l'aide d'un protocole *in vivo*. Ce protocole a été élaboré à partir de *E. coli* (70) et a été appliqué par la suite à des cellules de mammifère. Dans ce protocole, on soumet d'abord l'ADN nouvellement répliqué à un marquage bref à la  $^3\text{H}$ -thymidine suivi d'une "chasse" du radioisotope. Par la suite, on sépare l'ADN sur un gradient de sucrose alcalin et on mesure finalement la radioactivité dans chaque couche du gradient. Cette stratégie a permis, avec différents temps de marquage-chassé, de comparer ce qui se produit chez des cellules exposées à un rayonnement UV et chez des cellules non exposées. On

a ainsi observé que la taille de l'ADN non irradié augmentait avec le temps jusqu'à atteindre sa taille maximale. Par contre, l'ADN exposé au rayonnement UV était plus court et prenait beaucoup plus de temps à atteindre sa taille maximale (70). On a émis l'hypothèse que les courts fragments d'ADN sont causés par la présence de discontinuités dans le brin nouvellement répliqué, chaque discontinuité se trouvant en face d'un dimère de pyrimidine (29). Pour déterminer si les brèches étaient comblées par synthèse *de novo* ou par recombinaison, on a ajouté les étapes suivantes au protocole. Dans l'expérience, on a utilisé la bromodésoxyuridine (BrdUrd) lors de la "chasse", puis on a exposé l'ADN à une longueur d'onde de 313 nm. Lorsque de l'ADN renfermant de la BrdUrd est exposé à une longueur d'onde de 313 nm, le brin renfermant la BrdUrd est coupé. En comparant l'ADN soumis ou non à la chasse, on peut établir si l'on est en présence de recombinaison ou de synthèse *de novo*. Si les brèches sont comblées par synthèse *de novo*, la BrdUrd sera incorporée dans l'ADN et l'exposition subséquente à la longueur d'onde de 313 nm créera des coupures dans le brin nouvellement synthétisé et le profil de l'ADN dans le gradient de sucrose alcalin sera semblable à celui de l'ADN avant la chasse. Si les brèches sont comblées par recombinaison, ce sera le brin parental d'ADN qui comblera la brèche dans l'ADN endommagé. L'exposition subséquente de cet ADN à une longueur d'onde de 313 nm ne créera pas de coupures dans le brin nouvellement synthétisé, car aucune BrdUrd n'a été incorporée. En utilisant ce protocole avec des cellules de souris, le groupe de Lehmann a montré que la recombinaison ne semblait pas intervenir dans le comblement des brèches et que la synthèse *de novo* était le mécanisme de choix dans ce cas (42). Toutefois, ces chercheurs n'ont pu éliminer la possibilité qu'une synthèse *de novo* prédominante puisse masquer une faible occurrence de recombinaison.

Des protocoles *in vitro* permettent également d'étudier la RPR. On a créé un plasmide renfermant l'origine de réplication SV40 qui permet la réplication de l'ADN après ajout d'un extrait cellulaire et de l'antigène grand T du virus SV40 (1, 45, 46, 98). L'extrait cellulaire fournit toutes les protéines nécessaires à la réplication de l'ADN et l'antigène grand T se fixe à l'origine de réplication du SV40 et amorce le déroulement de l'ADN pour permettre aux protéines de l'extrait cellulaire d'amorcer la réplication (18). À l'aide de cette technique et en comparant de l'ADN irradié et non irradié, le groupe de Kathleen Dixon a montré que la réplication *in vitro* donne des résultats semblables à ce qu'on observe *in vivo* au niveau de l'inhibition de la croissance du nouveau brin et de la mutagenicité. Ces chercheurs ont montré que 1) les mutations dans l'ADN irradié sont principalement du type de C à T comme *in vivo*, 2) le traitement de l'ADN endommagé par le rayonnement UV à la photolyase d'*E. coli* avant la réplication supprime l'inhibition de la réplication et la mutagenèse induite, 3) le traitement à la T4 endonucléase V de l'ADN répliqué montre que les dimères de pyrimidine sont encore présents après la réplication (12). Des travaux semblables effectués par le groupe de Kunkel ont corroboré ces résultats (85). Dans l'ensemble, ces données indiquent qu'un tel système peut reproduire fidèlement ce qui se passe *in vivo*. En outre, ce système permet de montrer que, comme *in vivo*, des protéines cellulaires peuvent faire la synthèse translésion des dimères de pyrimidine et que les dimères de pyrimidine sont les lésions qui causent les mutations. Des expériences à l'aide de dimères de pyrimidine situés dans le brin primaire (leading) ou dans le brin secondaire (lagging) ont permis de caractériser davantage le processus de RPR chez l'humain (82). On a ainsi observé que l'efficacité de la synthèse en aval du dimère était légèrement différente dans le brin primaire et le brin secondaire (soit de 22 % et de 13 % respectivement). De plus, lorsque le dimère était situé dans le brin secondaire, la synthèse rétrograde était bloquée au niveau de la lésion, laissant une brèche s'étendant de

la lésion jusqu'au fragment d'Okasaki suivant. Lorsque le dimère était situé dans le brin primaire, la synthèse était bloquée au niveau des deux brins. Cependant, on a observé un découplage des fourches de réplication menant à une réplication préférentielle du brin non endommagé.

La RPR peut être étudiée à l'aide de modèles faisant appel à des cultures de cellules humaines et de cellules de rongeur. La mutagenèse varie essentiellement en fonction de deux processus : 1) la capacité de réparer les lésions avant la réplication et 2) la capacité de répliquer l'ADN endommagé avec le moins d'erreurs possible. Chez l'humain, les patients atteints de xeroderma pigmentosum (XP) présentent de fortes probabilités d'avoir un cancer de la peau. Le XP est une maladie héréditaire récessive rare caractérisée par une photosensibilité élevée des régions de la peau exposées et par des troubles pigmentaires (44, 79 et références données dans ces publications). Les cellules de ces patients sont très sensibles à l'effet mutagénique du rayonnement UV. On a montré que les cellules de ces patients présentent une déficience au niveau du processus de réparation par excision de nucléotides (une voie de réparation qui élimine les lésions provoquées par le rayonnement UV). Il y a 7 groupes de complémentation dans cette maladie, dont chacun est déficient en une protéine différente de la voie de réparation par excision de nucléotides. Les lésions de l'ADN provoquées par le rayonnement UV ne pouvant être éliminées avant la réplication, les mécanismes permettant la réplication de l'ADN endommagé sont surchargés et donnent lieu à davantage d'erreurs. Ces erreurs sont à l'origine de mutations qui mènent au cancer. Un autre membre (variant) du groupe XP, Xeroderma pigmentosum variant (XPV) présente les mêmes caractéristiques que XP sauf que chez ces patients 1) le processus de réparation par excision de nucléotides est normal et 2) le spectre des mutations est modifié. Le spectre des mutations induites par le rayonnement UV chez les patients atteints de XPV se caractérise par une prédominance de mutations de

type transversion, alors que chez les cellules normales, les mutations sont surtout de type transition (93, 94). Il a été démontré, en utilisant le protocole *in vivo* (43) que l'ADN de XPV exposé aux rayons UV est plus court que l'ADN de cellules normales exposées aux rayons UV. Pour cette raison, XPV prend beaucoup plus de temps (si on compare aux cellules normales) pour arriver à l'ADN pleine longueur après irradiation aux UV. Ces derniers résultats ainsi que ceux obtenus à l'aide du protocole *in vitro* (16, 83) mentionné précédemment, montrent que XPV est déficient dans une des voies de réparation post-réplicationnelle nous fournissant ainsi un mutant pour étudier le phénomène. Dans ce cas, les cellules des patients atteints de XPV peuvent réparer les dommages causés par le rayonnement UV avant la réplication, mais elles ne peuvent pas agir efficacement sur les quelques lésions qui restent après la réplication, ce qui entraîne des erreurs. Encore là, les mutations causées par ces erreurs mènent au cancer.

Les cellules ovariennes de hamster chinois (cellules CHO) fournissent un autre modèle d'étude de la RPR. Les cellules CHO sont presque déficientes (comparativement aux cellules humaines) au niveau du processus de réparation par excision de nucléotides, mais elles ne sont pas très sensibles à l'effet mutagénique du rayonnement UV. Les cellules CHO survivent parce que leur processus de RPR est très efficace. Les cellules CHO fournissent donc un excellent modèle d'étude de la RPR. En outre, le groupe de Waldren a mis au point une lignée cellulaire déficiente au niveau de la RPR appelée CHO-UV-1 (27, 78). Cette lignée cellulaire est hypersensible au rayonnement UV et est hypomutable comparativement à la lignée cellulaire parentale. Le phénotype des cellules CHO-UV-1 se comporte de manière récessif (démonstré par des expériences de fusion cellulaire) (78). La déficience au niveau de la RPR a été confirmée à l'aide du protocole *in vivo* susmentionné, mais elle est légèrement différente de celle observée chez les patients atteints de XPV. Contrairement

aux cellules de XPV chez qui l'ADN nouvellement synthétisé est plus court que chez les cellules normales, les cellules CHO-UV-1 présentent un ADN nouvellement synthétisé de même taille que celui des cellules normales, mais dont le taux de croissance est plus lent (78). Le modèle humain (XPV) et le modèle de rongeur (CHO) devraient nous aider à élucider le mécanisme de la RPR. Enfin, une comparaison des modèles XPV et CHO-UV-1 nous indique qu'ils sont probablement déficients au niveau de deux voies différentes de la RPR, étant donné que les cellules XPV sont hypermutables et que les cellules CHO-UV-1 sont hypomutables.

Dans notre laboratoire, nous avons mis au point un essai qui mesure la synthèse d'ADN. Cette technique utilise une matrice d'ADN renfermant un seul dimère de thymine à un site spécifique et une origine de réplication SV40. Ce système permet l'emploi d'un extrait cellulaire pour répliquer la matrice avec la seule addition de l'antigène grand T du virus SV40. Cette essai nous a permis de montrer que l'extrait de cellules CTAG (lignée cellulaire dérivée d'un patient atteint de XPV) est déficient au niveau de la synthèse translésion (16, 83) et que l'extrait cellulaire Hela (activité de RPR normale) est actif au niveau de la synthèse translésion (13). En outre, on a montré que l'ajout d'une certaine quantité d'extrait de cellules Hela à l'extrait de cellules CTAG suffit à rétablir son activité de synthèse translésion (complémentation). Cette observation indique que la protéine XPV n'agit probablement pas par inhibition d'une activité quelconque.

Le but de mon projet est d'isoler la ou les protéines intervenant dans la RPR dans les cellules CHO. Mon raisonnement est le suivant : si l'extrait de cellules CHO renferme une activité complémentaire, l'isolement de cette activité fournirait des données biochimiques permettant une bonne comparaison avec l'activité complémentaire chez l'humain. Par ailleurs, comme le processus

de RPR est très actif chez les cellules CHO, ces dernières devraient produire davantage de protéines intervenant dans ces voies de réparation et ces protéines devraient être plus faciles à isoler.

Mon projet comporte trois stratégies différentes :

1) Utilisation d'extraits de cellules CHO pour compléter la déficience au niveau du mécanisme de réparation post-répliationnelle chez les cellules CHO-UV-1. Cette stratégie repose sur la résolution d'un problème. L'extrait de cellules CHO ne peut pratiquement pas utiliser l'origine de répliation SV40 et répliquer une matrice d'ADN (46); en effet son activité à ce chapitre ne correspond qu'à 1 % de l'activité d'un extrait de cellules humaines. Par conséquent, le signal fourni par notre essai est trop faible et ne peut pas être interprété. Ce problème s'est également présenté avec des extraits de cellules de souris. L'extrait de cellules de souris ne peut pas utiliser l'origine de répliation SV40 *in vivo* et *in vitro* (46, 74). On a montré que la polymérase-alpha-primase est importante pour la répliation de l'ADN comportant l'origine de répliation SV40 *in vitro*, étant donné qu'on observe une inhibition de la répliation lorsqu'on ajoute de l'aphidicoline (un inhibiteur de la polymérase-alpha-primase) au milieu de réaction (98). Dans une série d'expériences, le groupe de Hurwitz a caractérisé plus à fond l'importance de la polymérase-alpha-primase dans la répliation d'ADN renfermant l'origine de répliation SV40 *in vitro*. Ces chercheurs ont montré que les polymérases-alpha-primases de cellules Hela et de cellules de singe sont interchangeable et peuvent rétablir la répliation dans les extraits de cellules Hela ou de singe déficients en polymérase-alpha-primase (57). Par ailleurs, l'addition de polymérase-alpha-primase purifiée provenant de cellules Hela à un extrait de cellules de souris rétablit complètement l'activité de répliation (57). Dans un système similaire utilisant l'origine de répliation du virus du polyome (Py), on observe l'inverse.



L'extrait de cellules de souris est très efficace dans la réplication d'ADN renfermant l'origine de réplication du Py, alors que l'extrait de cellules Hela offre une piètre performance à ce chapitre (56). L'addition de polymérase-alpha-primase de souris purifiée à un extrait de cellules Hela rétablit complètement son activité de réplication (56). Dans l'ensemble, ces données indiquent que la polymérase-alpha-primase a un rôle à jouer dans la détermination de la spécificité des virus envers les espèces (56, 73). Si nous arrivons à rétablir l'activité de réplication des extraits de cellules CHO en ajoutant de la polymérase-alpha-primase humaine au milieu de réaction, notre essai fournira un signal fiable. Si nous n'y arrivons pas, il faudra avoir recours à la deuxième stratégie (voir ci-après).

2) Utilisation d'un extrait de cellules CHO pour compléter la déficience au niveau de la réparation post-réplicationnelle d'un extrait de cellules CTAG (XPV). Nous prévoyons que l'extrait de cellules CTAG fournira toutes les protéines nécessaires à la réplication de l'ADN et que l'extrait de cellules CHO fournira la ou les protéines nécessaires à l'activité de réparation post-réplicationnelle.

3) Si l'extrait de cellules CHO complète l'extrait de cellules XPV, nous pourrions également essayer la même stratégie avec un extrait de cellules CHO-UV-1. Si les extraits de cellules XPV et CHO-UV-1 comportent une déficience au niveau de la même voie, on n'observera pas de complémentation. S'il y a complémentation, cela signifiera que les deux lignées cellulaires sont déficientes au niveau de voies différentes et qu'elles pourront ainsi fournir un autre modèle d'étude.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### **Matériel**

La souche XL1-Blue provient de Stratagene et la souche CJ236, de Bio-Rad. Les enzymes de restriction ont toutes été obtenues de New England Biolabs, sauf MboI qui provient de Gibco BRL. La T4ADN-polymérase et la T4 ADN-ligase ont été obtenues de Boehringer Mannheim. L'enzyme Sequenase version 2.0 provient de Amersham life science. L'antigène grand T de SV40 provient de Molecular Biology Resources (Milwaukee, Wt). La polymérase-alpha-primase a été fournie gracieusement par Fred Perrino. Les extraits cellulaires ont été préparés par la méthode de Li et Kelly (46).

### **Préparation de la matrice**

Le plasmide pBluescript II KS (Stratagene) a été modifié de la façon suivante (voir la figure 4 à la page 19): Un oligonucléotide de 20-mer contenant un site MfeI a été inséré à la position 965 et l'origine de répliation du SV40 a été insérée entre les sites de restriction BamHI (position 680) et HindIII (position 719). Ce nouveau plasmide, qui comporte 3 298 paires de bases, a été nommé M3-. L'ADN simple brin du plasmide M3- a été obtenu à l'aide du phage auxiliaire M13KO7 selon le protocole décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology" (2). Les particules de phages ainsi que leur ADN ont été extraits selon le protocole de Maniatis (72). Pour séparer l'ADN simple brin de M3- de l'ADN simple brin de M13KO7, l'ADN extrait est mis dans du TE + 1M NaCl et mis sur une colonne (175 ml de résine sur une colonne Pharmacia C 26/40) de chromatographie Sephacryl S-1000 (Pharmacia biotech). Le débit de la colonne est de 0.5 ml/min, des fractions de 5 ml ont été collectées et toutes les fractions contenant l'ADN simple brin de M3- ont été mis dans un seul tube ("pool"). Une amorce de 20 nucléotides renfermant un seul dimère de thymine à un endroit spécifique a été hybridée à l'ADN simple brin de M3- purifié. L'hybridation se fait par chauffage de l'échantillon à 70 °C suivi d'un refroidissement à 37 °C par incubation à la température de la pièce. Le milieu de réaction est composé de 20 mM de Tris-HCl à pH 7,4, de 2 mM de MgCl<sub>2</sub>,

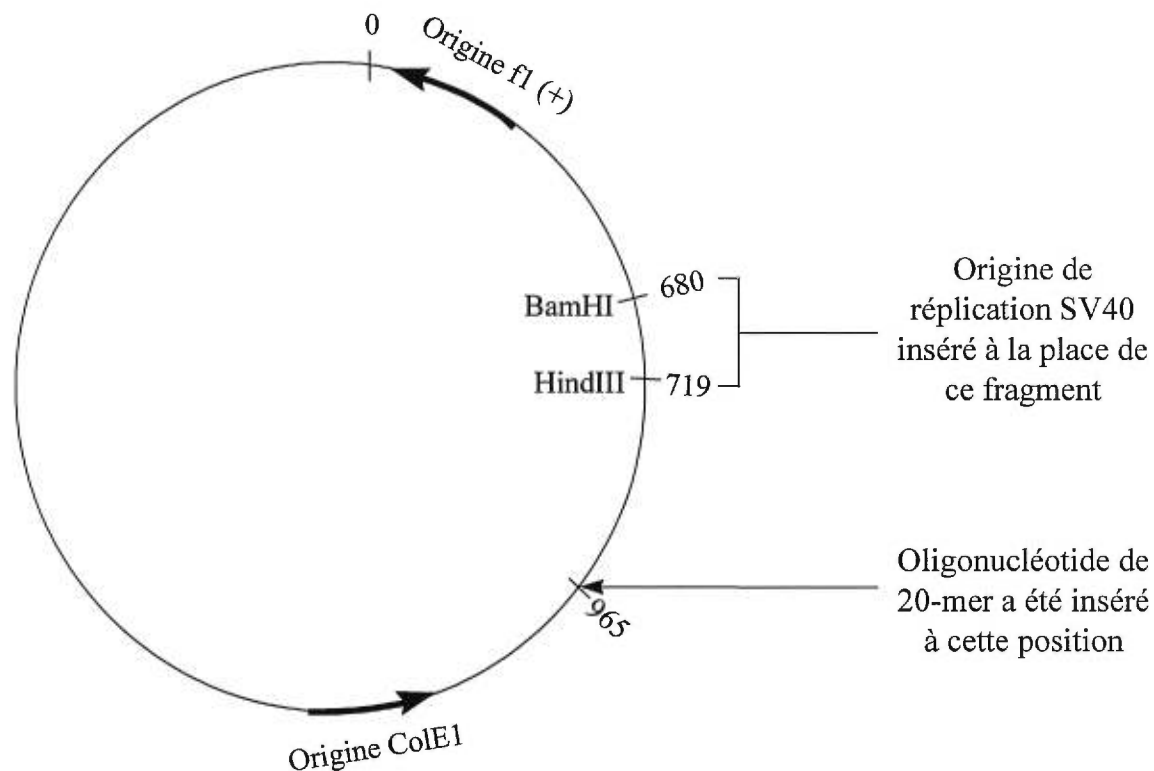


Figure 4: **Modifications apportées au plasmide pBluescript II KS**

Le plasmide pBluescript II KS (Stratagene) a été modifié de la façon suivante :  
 Un oligonucléotide de 20-mer contenant un site MfeI a été inséré à la position 965 et l'origine de répllication du SV40 a été insérée entre les sites de restriction BamHI (position 680) et HindIII (position 719). Ce nouveau plasmide, qui comporte 3 298 paires de bases, a été nommé M3-.

de 50 mM de NaCl, de 1 pmole d'ADN simple brin et de 20 pmoles d'amorce dans un volume final de 50  $\mu$ L. Le deuxième brin est synthétisé à l'aide de la T4 ADN-polymérase et la ligation est effectuée à l'aide de la T4 ADN-ligase. Les conditions de la polymérisation et de la ligation sont les suivantes : à l'ADN hybridé, on ajoute 10  $\mu$ L de tampon de synthèse (5 mM de dNTP, 10 mM d'ATP, 100 mM de Tris-HCl à pH 7,4, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de DTT), 1  $\mu$ L de glycérol à 50 %, 4  $\mu$ L (20 U) de T4 ADN-ligase et 5  $\mu$ L (5 U) de T4 ADN-polymérase. Le milieu est incubé 5 minutes sur glace, 5 minutes à la température de la pièce et 90 minutes à 37 °C. Après confirmation sur gel d'agarose 8 % que la réaction s'est bien déroulée, l'ADN est purifié sur une colonne Qiagen tip100 (Qiagen). L'ADN est alors méthylé à l'aide de la DAM méthylase selon le protocole fourni par le fabricant. La réaction est contrôlée sur gel à l'aide de l'enzyme de restriction DpnI sensible à la méthylation. Si la réaction est complète (si tout l'ADN est coupé par DpnI), l'ADN méthylé est alors purifié sur une colonne Qiagen tip100. Pour éliminer tout produit provenant d'une ligation et/ou d'une polymérisation incomplète, l'ADN méthylé purifié est digéré à l'exonucléase III selon le protocole fourni par le fabricant. Après un contrôle de l'efficacité de la digestion sur gel, l'ADN est purifié sur une colonne Qiagen tip100. Pour éliminer l'ADN simple brin, l'échantillon est passé sur une colonne de cellulose BND (Sigma). L'échantillon élué est alors vérifié dans l'essai de réplification (voir ci-après). Si l'échantillon n'est pas actif, on le purifie sur une colonne Qiagen tip100.

\*\*\* La même méthode est utilisée avec une amorce possédant la même séquence, mais sans la lésion (dimère de thymine). On obtient ainsi une matrice témoin de base (non endommagé). \*\*\*

### **Préparation de l'étalon interne**

On mélange 2,5 pmoles d'amorce et 1  $\mu$ g d'ADN simple brin dans un tampon de sequenase 1X (volume total de 10  $\mu$ L). On réalise l'hybridation en chauffant le tube à 70 °C dans un bloc chauffant, puis en laissant le bloc parvenir à 37 °C (ce qui prend environ 35 minutes). Lorsque la température de 37 °C est atteinte, on ajoute 1 mM de DTT, 40  $\mu$ M de chacun des dNTP, 50  $\mu$ L de <sup>3</sup>H-TTP (80.9 Ci/mmele, 1 mCi au total dans 400  $\mu$ L), du tampon sequenase de manière à

obtenir 1X et 26 U de sequenase II dans un volume total de 100  $\mu\text{L}$ . Après une incubation de 90 min. à 37 °C et de 10 min. à 65 °C, on met 20  $\mu\text{L}$  du produit de réaction sur une colonne de Sepharose Cl 4B préalablement lavée au TE. L'ADN est élué dans un volume total de 150  $\mu\text{L}$  puis l'incorporation du tritium est mesurée.

### **Essai de réplication**

Le milieu de réaction est le suivant : 30 mM d'Hepes à pH 7,8, 7 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de CTP, de GTP et d'UTP, 4 mM d'ATP, 0,1 mM de dATP, de dGTP et de dTTP, 20  $\mu\text{M}$  de dCTP, 40  $\mu\text{M}$  de phosphate de créatine, 0,1 mg/mL de créatine-kinase, 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,375  $\mu\text{L}$  d' $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dCTP (3 000 Ci/mme; 250  $\mu\text{Ci}$  au total dans 25  $\mu\text{L}$ ), 0,5  $\mu\text{g}$  d'antigène grand T, 3,25  $\mu\text{L}$  d'échantillon de protéines (extrait cellulaire ou fraction séparée sur colonne) et 12,5 ng de matrice d'ADN. Le volume total du milieu de réaction est de 12,5  $\mu\text{L}$  et l'incubation se fait à 37 °C pendant 90 minutes. On arrête la réaction en ajoutant 1,25  $\mu\text{L}$  de SDS à 20 %, 1,25  $\mu\text{L}$  de protéinase K (20 mg/mL) et 5  $\mu\text{L}$  d'étalon interne, puis on incube à 50 °C pendant 60 minutes. On sépare ensuite le produit de réaction sur une colonne de 1 mL de Sepharose Cl 4B préalablement lavée avec du tampon "buffer 4" 1X (New England Biolabs). L'ADN est élué dans un volume total de 150  $\mu\text{L}$ .

### **Digestion par les enzymes de restriction**

L'échantillon d'ADN est digéré en deux étapes. On utilise d'abord MfeI, puis MboI et DpnI. Pour la première digestion, on ajoute 5 U de MfeI à 20  $\mu\text{L}$  d'ADN provenant de la colonne. Après une incubation de 60 minutes à 37 °C, on ajoute 0,75 U de DpnI, 0,5 U de MboI et du NaCl pour obtenir une concentration finale de 200 mM (volume final de 30  $\mu\text{L}$ ). On incube ce mélange pendant 60 minutes à 37 °C, puis pendant 15 minutes à 65 °C.

## Normalisation

On utilise un compteur bêta (LKB Wallac modèle 1217 Rackbeta) pour déterminer la radioactivité dans 5  $\mu$ L de chaque échantillon. On normalise les résultats en fonction de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  de base dans la matrice témoin (sans lésion). Une valeur fixe de 1 est mise à l'échantillon ayant répliqué l'ADN non endommagé qui possède la plus basse incorporation de  $^{32}\text{P}$ . Les autres valeurs sont déterminées par la formule suivante: la valeur la plus basse d'incorporation de  $^{32}\text{P}$  parmi les échantillons ayant répliqué l'ADN non endommagé / la valeur de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  de l'échantillon ayant répliqué l'ADN non endommagé. Les nombres obtenus vont varier entre 0 et 1 et représenter la normalisation du  $^{32}\text{P}$ . Les données sont également normalisés pour la récupération de l'ADN. Le standard interne ajouté avant la purification de l'ADN sur la colonne Sépharose Cl 4B nous permet de comparer la récupération de l'ADN après que toutes les étapes soient complétées (purification et digestion). Chaque échantillon provenant des mêmes conditions de réplication (même extrait cellulaire ajouté) sont normalisés entre eux pour l'incorporation de tritium. La valeur 1 de normalisation de tritium est attribué arbitrairement à l'échantillon ayant répliqué l'ADN non endommagé. Tous les échantillons provenant des même conditions de réplication sont par la suite normalisés à l'aide de l'équation suivante: valeur d'incorporation de tritium de l'échantillon ayant répliqué l'ADN non endommagé / valeur d'incorporation de tritium de l'échantillon. En multipliant la valeur du facteur de normalisation de  $^{32}\text{P}$  par la valeur du facteur de normalisation de tritium, on obtient la valeur du facteur de normalisation global. Les volumes mis sur gel d'agarose sont en conséquence d'un volume maximal que l'on peut mettre sur le gel multiplié par le facteur de normalisation global de chaque échantillon. Par exemple, si le facteur global de normalisation de deux échantillons différents sont respectivement de 1.0 et 0.75 et que le volume maximal est de 20  $\mu$ L, les volumes respectifs qui vont être mis sur le gel seront de 20  $\mu$ L et 15  $\mu$ L.

### **Gel d'agarose**

Après la normalisation, les volumes déterminés sont mis sur un gel d'agarose 0,8 % renfermant du bromure d'éthidium. La migration prend 2 heures à 200 volts. Après la migration, on précipite l'ADN dans le gel en immergeant ce dernier dans une solution renfermant 10 % de méthanol et 10 % d'acide acétique pendant 30 minutes. On lave alors le gel avec de l'eau distillée pendant 15 minutes, puis on le sèche à l'aide d'un séchoir de gel d'acrylamide. Le gel est alors prêt à être exposé sur le PhosphorImager.

### **Colonne de phosphocellulose P-11**

On a suivi le protocole utilisé par Li et Kelly (46) pour la séparation sur cette colonne. En bref, on centrifuge l'extrait cellulaire et on le filtre avant de le déposer sur une petite colonne P-11 (5 mL de résine dans une colonne Pharmacia C 10/10). On utilise un débit de 0,3 mL/min et 3 fractions sont recueillies (CFI, CFII et CFIII). La fraction CFI correspond au tampon sortant ("flow through") de la colonne lorsque les protéines sont mises sur la colonne. La fraction CFII est obtenue en lavant la colonne avec le tampon P + 500 mM KCl. Finalement la fraction CFIII est obtenue en lavant la colonne avec le tampon P + 2M KCl. On recueille les fractions CF I, CF II et CF III, puis on les dialyse contre un tampon H renfermant 15 mM de KCl avant de tester leur activité dans notre essai.

### **Colonne de phénylsépharose**

On a utilisé cette colonne selon le protocole fourni (Pharmacia). On a recueilli deux ou trois fractions selon l'expérience. On a utilisé les tampons suivants : 50 mM de phosphate de sodium avec 1 M de sulfate d'ammonium; 50 mM de phosphate de sodium avec 500 mM de sulfate d'ammonium, puis 50 mM de phosphate de sodium. On dialyse l'échantillon CF II sortant de la colonne P-11 contre le tampon de départ (50 mM de phosphate de sodium avec 1 M de sulfate d'ammonium) avant de le déposer sur la colonne de phénylsépharose. On

recueille les fractions P1, P2 et P3 et on les dialyse contre le tampon H renfermant 15 mM de KCl avant de mesurer leur activité dans notre essai.



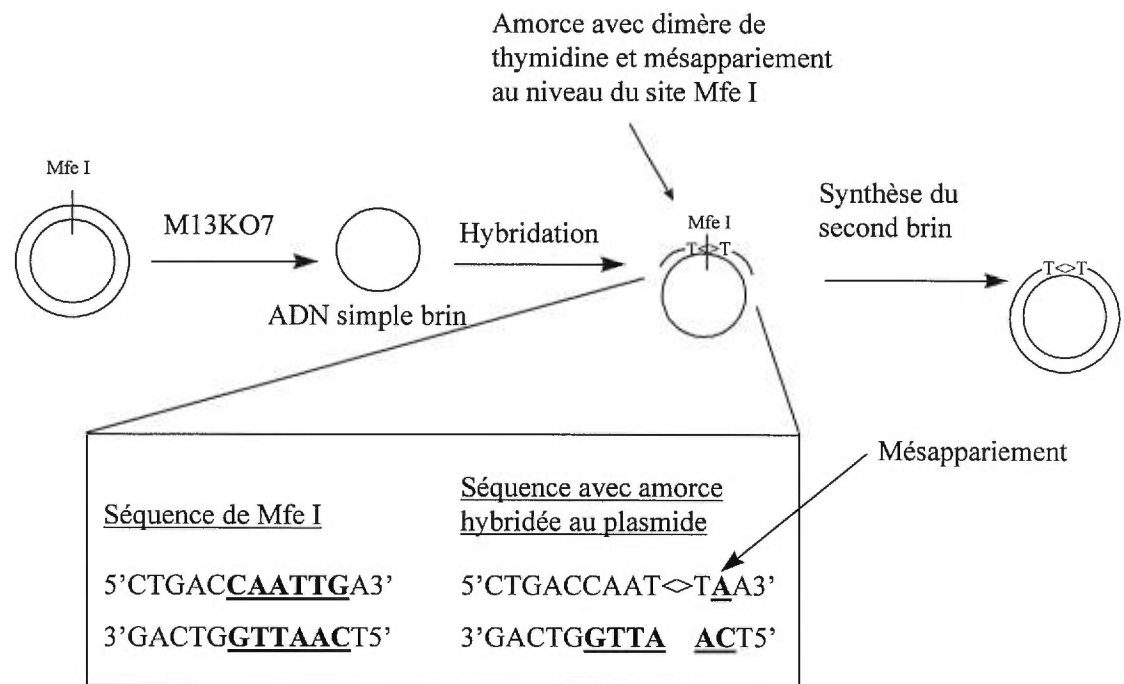


Figure 5: **Construction de la matrice endommagée**

L'ADN simple brin du plasmide M3- a été obtenu à l'aide du phage auxiliaire M13KO7. Une amorce de 20 nucléotides renfermant un seul dimère de thymine à un endroit spécifique a été hybridée à l'ADN simple brin de M3- purifié. Le second brin est synthétisé à l'aide de la T4 ADN-polymérase et la ligation est effectuée à l'aide de la T4 ADN-ligase. La matrice est construite de façon à ce que le dimère de thymine soit localisé au niveau du seul site de restriction MfeI du plasmide. Le brin portant le dimère de thymine comporte également un mésappariement au site de restriction MfeI. Ce mésappariement nous permet de distinguer l'ADN qui a été répliqué à l'aide du brin endommagé (qui est insensible à MfeI étant donné qu'il y a mésappariement) de l'ADN qui a été répliqué à l'aide du brin non endommagé (sensible à la MfeI). Ainsi, lorsqu'on digère l'ADN répliqué avec MfeI, les molécules provenant du brin non endommagé seront linéarisées, alors que celles provenant du brin endommagé resteront circulaires.

## RÉSULTATS

Avant de présenter les résultats, j'indiquerai brièvement comment l'essai fonctionne et comment on interprète les gels. Premièrement, les principaux éléments nécessaires à une réplication *in vitro* sont une matrice spécifique (avec lésion ou non), un extrait cellulaire, du  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dCTP et l'antigène grand T du virus SV40. La matrice est répliquée, l'extrait cellulaire fournit toutes les protéines nécessaires à la réplication de la matrice d'ADN, le  $^{32}\text{P}$  marque l'ADN répliqué et l'antigène grand T se fixe à l'origine de réplication du SV40 et amorce le déroulement de l'ADN pour permettre aux protéines de l'extrait cellulaire d'amorcer la réplication. La matrice est construite de façon à ce que le dimère de thymine soit localisé au niveau du seul site de restriction MfeI du plasmide. Le brin portant le dimère de thymine comporte également un mésappariement au site de restriction MfeI (voir la figure 5 à la page 25). Ce mésappariement nous permet de distinguer l'ADN qui a été répliqué à l'aide du brin endommagé (qui est insensible à MfeI étant donné qu'il y a mésappariement) de l'ADN qui a été répliqué à l'aide du brin non endommagé (sensible à la MfeI). Ainsi, lorsqu'on digère l'ADN répliqué avec MfeI, les molécules provenant du brin non endommagé seront linéarisées, alors que celles provenant du brin endommagé resteront circulaires. La figure 6 (page 27) montre un exemple de résultats que cette technique nous permet d'obtenir. Dans cet exemple, l'extrait cellulaire de XPV seul a répliqué la matrice. Comme cet extrait cellulaire est déficient dans une des voies de RPR, il est incapable de répliquer le brin endommagé outre la lésion. Cependant la réplication du brin non endommagé est normale menant à de l'ADN circulaire double brin marqué au  $^{32}\text{P}$  (figure 6 couloir 1). Dans ce cas, à la fin de la réplication, seulement de l'ADN provenant de la réplication du brin non endommagé est présent. Comme le brin non endommagé possède le site de

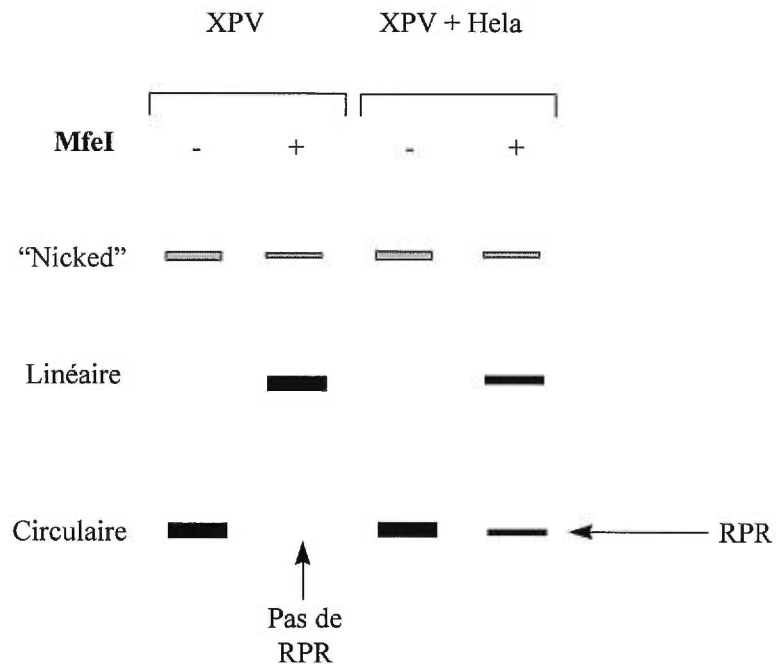


Figure 6: **Exemple de gel obtenu et interprétation des résultats**

Dans cet exemple, l'extrait cellulaire de XPV seul a répliqué la matrice. Comme cet extrait cellulaire est déficient dans une des voies de RPR, il est incapable de répliquer le brin endommagé outre la lésion. Cependant la réplification du brin non endommagé est normale menant à de l'ADN circulaire double brin marqué au  $^{32}\text{P}$  (couloir 1). Dans ce cas, à la fin de la réplification, seulement de l'ADN provenant de la réplification du brin non endommagé est présent. Comme le brin non endommagé possède le site de restriction MfeI, toute l'ADN est linéarisé lorsque l'on ajoute l'enzyme MfeI (couloir 2). Dans la seconde expérience sur ce gel, l'extrait cellulaire de XPV est mélangé avec de l'extrait cellulaire de HeLa (normal en RPR) dans l'essai de réplification. Comme l'extrait cellulaire de HeLa fournit les protéines de RPR à l'extrait cellulaire de XPV, le brin non endommagé ainsi que le brin endommagé sont répliqués et produisent des molécules marquées au  $^{32}\text{P}$  (couloir 3). Cependant, lorsque l'on ajoute l'enzyme MfeI, l'ADN répliqué à partir du brin non endommagé (contenant le site de restriction MfeI) est linéarisé et l'ADN répliqué à partir du brin endommagé (qui ne contient pas le site de restriction MfeI) restera circulaire (couloir 4). La clé afin d'interpréter les gels suivants sera de regarder la présence d'une bande d'ADN circulaire lorsqu'il y a ajout de l'enzyme MfeI. S'il y en a une, c'est qu'il y a eu RPR.

NOMS	Réplication <i>in vitro</i>	RPR
CTAG (XPV)	+++	-
Hela	++	++
CHO	-	+++
CHO-UV1	-	-

Tableau I: **Lignées cellulaires utilisées lors de mon projet**

Ce tableau indique les lignées cellulaires utilisées dans le cadre du projet ainsi que leur capacité de réplication *in vitro* et leur activité de RPR. Il est à noter que le signe (-) ne représente pas nécessairement une complète déficience mais plutôt soit une déficience partielle ou que l'activité est quasi nulle si on la compare aux autres lignées.

restriction MfeI, toute l'ADN est linéarisé lorsque l'on ajoute l'enzyme MfeI (figure 6 couloir 2). Dans la seconde expérience sur ce gel, l'extrait cellulaire de XPV est mélangé avec de l'extrait cellulaire de Hela (normal en RPR) dans l'essai de réplication. Comme l'extrait cellulaire de Hela fournit les protéines de RPR à l'extrait cellulaire de XPV, le brin non endommagé ainsi que le brin endommagé sont répliqués et produisent des molécules marquées au  $^{32}\text{P}$  (figure 6 couloir 3). Cependant, lorsque l'on ajoute l'enzyme MfeI, l'ADN répliqué à partir du brin non endommagé (contenant le site de restriction MfeI) est linéarisé et l'ADN répliqué à partir du brin endommagé (qui ne contient pas le site de restriction MfeI) restera circulaire (figure 6 couloir 4). La clé afin d'interpréter les gels suivants sera de regarder la présence d'une bande d'ADN circulaire lorsqu'il y a ajout de l'enzyme MfeI. S'il y en a une, c'est qu'il y a eu RPR. Le tableau I indique les lignées cellulaires utilisées dans le cadre du projet ainsi que leur capacité de réplication *in vitro* et leur activité de RPR.

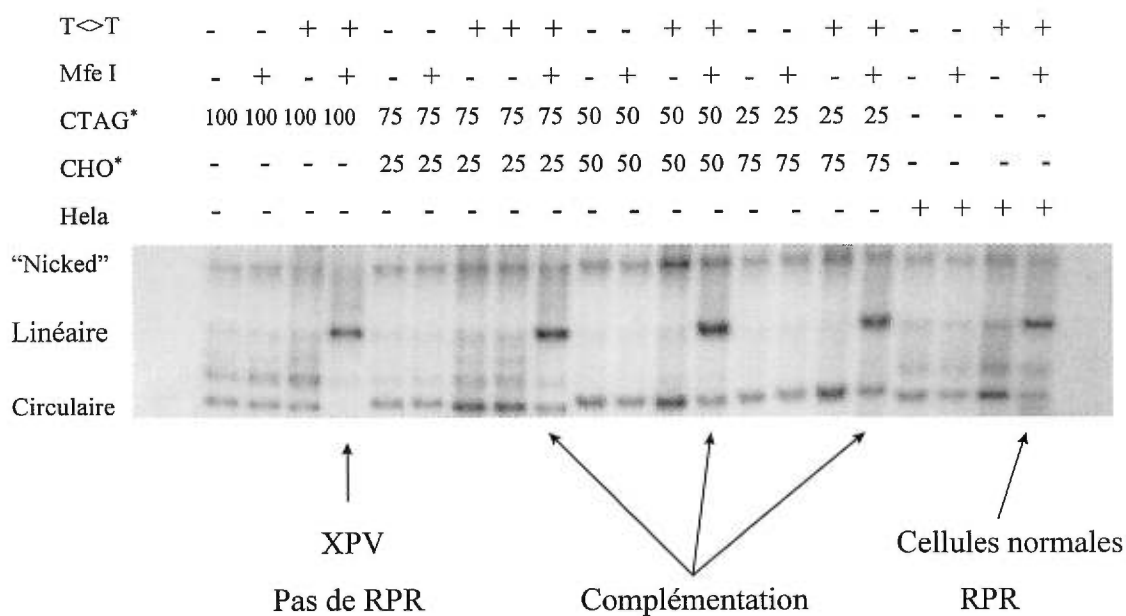
La première stratégie repose sur le rétablissement de l'activité de réplication *in vitro* des extraits de cellules CHO. On a ajouté la polymérase-alpha-primase à l'extrait de cellules CHO dans le but de rétablir la réplication *in vitro* de l'ADN renfermant l'origine de réplication SV40. Comme on peut le voir dans le tableau II, l'addition de quantités croissantes de polymérase-alpha-primase ne rétablit pas l'activité de réplication. On peut même observer une réduction de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  à cause de la diminution de la proportion d'extrait de cellules CHO. Il est donc impossible d'utiliser cette stratégie, car l'activité de réplication *in vitro* de l'extrait de cellules CHO utilisé seul n'est pas assez importante.

La deuxième stratégie fait appel à l'extrait de cellules CHO pour compléter un extrait de cellules CTAG (XPV). On voit que l'extrait de cellules CTAG seul ne possède pas d'activité de RPR (voir la figure 7 à la page 31, couloir 4). Lorsqu'on ajoute une petite quantité d'extrait de cellules CHO à l'extrait de cellules CTAG, on observe une certaine complémentation (figure 7,

<b>NOMS</b>	<b>Incorporation de <math>^{32}\text{P}</math></b>
CHO seul	107
CHO + Pol alpha (25%)	63
CHO + Pol alpha (50%)	71
CHO + Pol alpha (75%)	45
Pol alpha seul	40
Hela	2072

Tableau II: **Restauration de la réplication *in vitro* de l'extrait cellulaire CHO**

Différentes proportions de polymérase-alpha-primase ont été ajoutées à l'extrait cellulaire de CHO avant de l'utiliser dans l'essai de réplication. Les pourcentages correspondent à la fraction du volume total ajouté de polymérase-alpha-primase. Après l'essai de réplication ainsi que la séparation sur colonne Sépharose Cl 4B, la radioactivité contenue dans 5 µl de chacune des réactions est comptée (CPM).



\*Pourcentage de la quantité totale d'extrait cellulaire ajouté à la réaction.

Figure 7: **Complémentation de XPV par l'extrait cellulaire de CHO**

Différentes proportions des extraits cellulaires XPV et CHO sont mélangés ensemble avant de les tester dans l'essai de réplication. Après l'essai de réplication et la purification sur colonne Sépharose Cl 4B, les échantillons sont digérés avec MboI ainsi que DpnI et selon le cas, avec MfeI. Par la suite, la radioactivité de 5  $\mu$ l de chaque échantillon est comptée et les valeurs sont normalisées afin d'obtenir des volumes contenant des quantités équivalentes d'ADN. Les volumes normalisés d'ADN sont chargés sur un gel d'agarose 0.8% et le gel est migré 2 heures à 200 volts. Après la migration le gel est fixé 30 minutes à l'aide d'une solution contenant 10% méthanol et 10% acide acétique. Après un lavage de 15 min dans de l'eau distillée, le gel est séché dans un séchoir de gel d'acrylamide. Le gel est finalement exposé sur film et/ou sur phosphorimager.

<b>Noms</b>	<b>Incorporation de <math>^{32}\text{P}</math></b>
<b>CTAG seul</b>	2185
<b>75% CTAG + 25% CHO</b>	1356
<b>50% CTAG + 50% CHO</b>	740
<b>25% CTAG + 75% CHO</b>	704
<b>CHO seul</b>	59

**Tableau III: Correspondance entre l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  et la proportion de CTAG ajouté à l'essai de réplication**

Différentes proportions des extraits cellulaires XPV et CHO sont mélangés ensemble avant de les tester dans l'essai de réplication. Après l'essai de réplication et la purification sur colonne Sépharose Cl 4B, les échantillons sont digérés avec MboI ainsi que DpnI et selon le cas, avec MfeI. Par la suite, la radioactivité de 5 ul de chaque échantillon est comptée (CPM).



couloir 9). En outre, en augmentant la proportion d'extrait de cellules CHO, on observe deux phénomènes : 1) une diminution de la quantité de  $^{32}\text{P}$  incorporée (tableau III) et 2) une augmentation du taux de complémentation (figure 7, couloirs 9, 13 et 17). Ces taux de complémentation sont comparables à ceux observés avec le témoin positif (extrait de cellules Hela).

Étant donné que l'extrait de cellules CHO complémente l'extrait de cellules XPV, il était intéressant de vérifier si l'extrait de cellules CHO-UV-1 pouvait également le faire. La figure 8 (page 34) nous montre qu'il est assez difficile de l'affirmer étant donné qu'il y a linéarisation de l'ADN même en l'absence de l'enzyme de restriction MfeI (figure 8, couloirs 4 et 5). Toutefois, en diminuant la quantité d'extrait de cellules CHO-UV-1 ajouté à l'extrait de cellules CTAG, on observe une réduction de la linéarisation et on obtient une complémentation évidente avec la matrice endommagée (voir la figure 9 à la page 35, couloir 8). Comme on peut le voir dans la figure 9 (couloirs 8, 12, 16 et 20), l'extrait de cellules CHO-UV-1 complémente l'extrait de cellules CTAG. L'extrait de cellules CHO-UV-1 possède également une autre propriété dont nous n'avons pas encore parlé : il renferme un inhibiteur de la réplication. On observe également une diminution de l'inhibition de la réplication lorsqu'on diminue la quantité d'extrait de cellules CHO-UV-1 ajoutée à l'extrait de cellules CTAG (tableau IV).

L'étape suivante consistait à tenter d'isoler le ou les facteurs de l'extrait de cellules CHO responsables de la complémentation de l'extrait de cellules CTAG. Nous avons d'abord utilisé la chromatographie sur colonne de phosphocellulose P-11, une colonne échangeuse de cations. Cette colonne a donné trois fractions différentes que nous avons soumises à l'essai de réplication. Comme le montre la figure 10 (page 37), la fraction CF II (couloir 12) est celle qui renferme toute l'activité (à noter que la troisième fraction, non illustrée, se comporte comme la fraction CF I et ne donne aucune activité de complémentation). Cette première étape permet d'éliminer environ 75 % des protéines. Nous avons poursuivi la purification en soumettant la fraction CF II à une chromatographie sur colonne de phénylsépharose (interaction

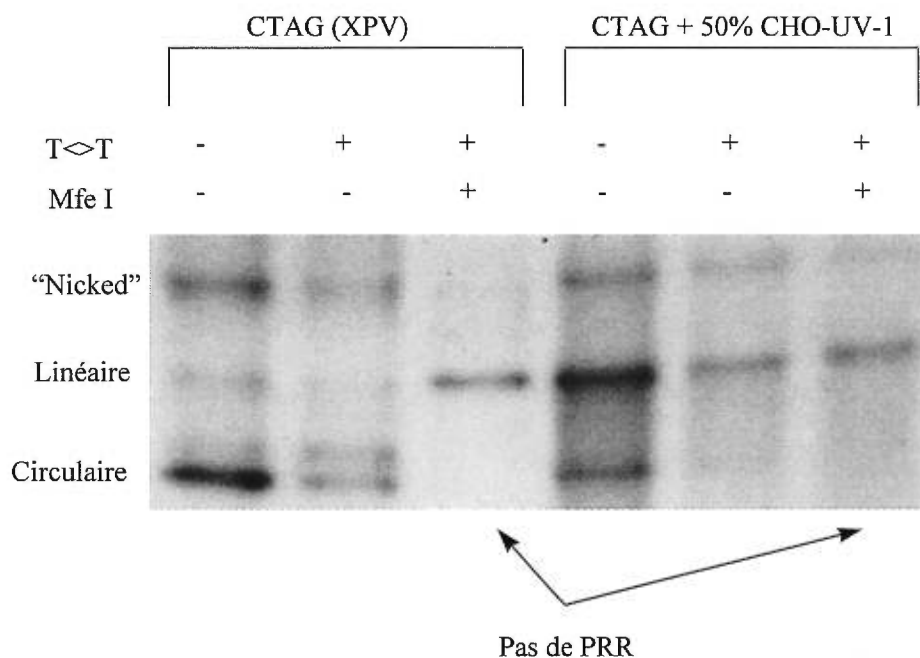
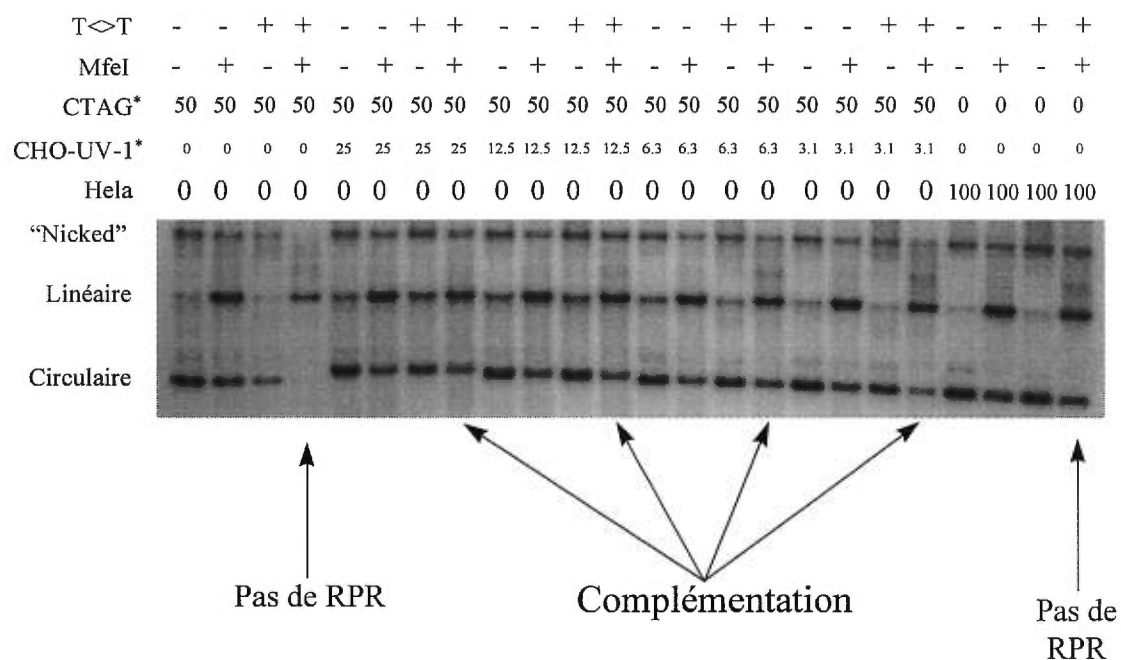


Figure 8: Complémentation de XPV par l'extrait cellulaire de CHO-UV-1

XPV seul ainsi qu'un mélange égal de XPV et CHO-UV-1 sont utilisés dans l'essai de réplication. Après l'essai de réplication et la purification sur colonne Sépharose Cl 4B, les échantillons sont digérés avec MboI ainsi que DpnI et selon le cas, avec MfeI. Par la suite, la radioactivité de 5  $\mu$ l de chaque échantillon est comptée et les valeurs sont normalisées afin d'obtenir des volumes contenant des quantités équivalentes d'ADN. Les volumes normalisés d'ADN sont chargés sur un gel d'agarose 0.8% et le gel est migré 2 heures à 200 volts. Après la migration le gel est fixé 30 minutes à l'aide d'une solution contenant 10% méthanol et 10% acide acétique. Après un lavage de 15 min dans de l'eau distillée, le gel est séché dans un séchoir de gel d'acrylamide. Le gel est finalement exposé sur film et/ou sur phosphorimager.



\*Pourcentage de la quantité totale d'extrait cellulaire ajouté à la réaction. L'eau a été utilisée afin de compléter à 100%.

Figure 9: **Complémentation de XPV par des quantités plus petite d'extrait cellulaire de CHO-UV-1**

Différentes proportions des extraits cellulaires XPV et CHO-UV-1 sont mélangés ensemble avant de les tester dans l'essai de réplication. Après l'essai de réplication et la purification sur colonne Sépharose Cl 4B, les échantillons sont digérés avec MboI ainsi que DpnI et selon le cas, avec MfeI. Par la suite, la radioactivité de 5 ul de chaque échantillon est comptée et les valeurs sont normalisées afin d'obtenir des volumes contenant des quantités équivalentes d'ADN. Les volumes normalisés d'ADN sont chargés sur un gel d'agarose 0.8% et le gel est migré 2 heures à 200 volts. Après la migration le gel est fixé 30 minutes à l'aide d'une solution contenant 10% méthanol et 10% acide acétique. Après un lavage de 15 min dans de l'eau distillée, le gel est séché dans un séchoir de gel d'acrylamide. Le gel est finalement exposé sur film et/ou sur phosphorimager.

<b>Noms</b>	<b>Incorporation de <math>^{32}\text{P}</math></b>
<b>CTAG seul</b>	1826
<b>CTAG + 25% CHO-UV-1</b>	606
<b>CTAG + 12.5% CHO-UV-1</b>	850
<b>CTAG + 6.3% CHO-UV-1</b>	1060
<b>CTAG + 3.1% CHO-UV-1</b>	1272

**Tableau IV: Activité inhibitrice de l'extrait cellulaire CHO-UV-1**

Différentes proportions des extraits cellulaires XPV et CHO-UV-1 sont mélangés ensemble avant de les tester dans l'essai de réplication. Après l'essai de réplication et la purification sur colonne Sépharose Cl 4B, les échantillons sont digérés avec MboI ainsi que DpnI et selon le cas, avec MfeI. Par la suite, la radioactivité de 5 ul de chaque échantillon est comptée (CPM). Les pourcentages de ce tableau représentent la fraction du volume total de protéines ajouté.

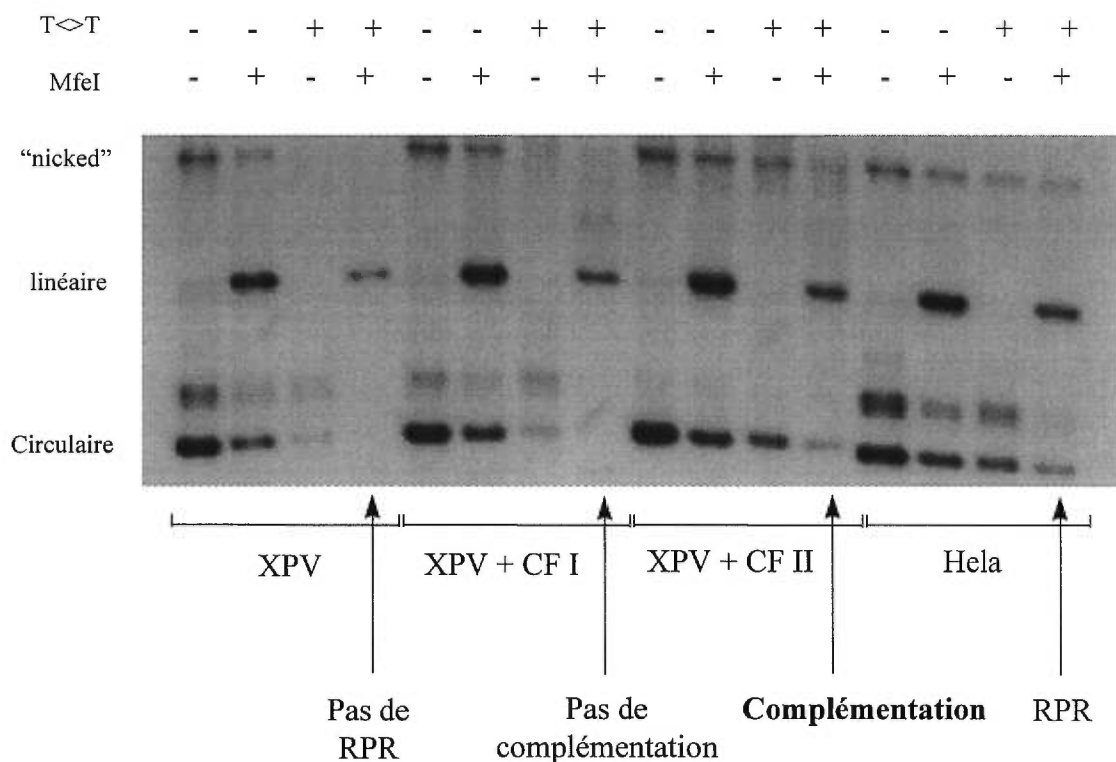


Figure 10: **Activité des fractions de la colonne phosphocellulose P-11**

Les différentes fractions obtenues de la colonne phosphocellulose P-11 sont mélangées en proportion égale à l'extrait de XPV avant de les tester dans l'essai de réplication. Après l'essai de réplication et la purification sur colonne Sépharose Cl 4B, les échantillons sont digérés avec MboI ainsi que DpnI et selon le cas, avec MfeI. Par la suite, la radioactivité de 5  $\mu$ l de chaque échantillon est comptée et les valeurs sont normalisées afin d'obtenir des volumes contenant des quantités équivalentes d'ADN. Les volumes normalisés d'ADN sont chargés sur un gel d'agarose 0.8% et le gel est migré 2 heures à 200 volts. Après la migration le gel est fixé 30 minutes à l'aide d'une solution contenant 10% méthanol et 10% acide acétique. Après un lavage de 15 min dans de l'eau distillée, le gel est séché dans un séchoir de gel d'acrylamide. Le gel est finalement exposé sur film et/ou sur phosphorimager.

hydrophobe). Deux ou trois fractions ont été éluées de cette colonne selon l'expérience. Comme le montre la figure 11 (page 39), aucune des fractions ne peut compléter l'extrait de cellules CTAG.

Pour vérifier si l'activité de complémentation survit à la chromatographie sur la colonne de phénylsépharose, nous avons mesuré cette activité sur les fractions réunies. La figure 12 (page 40) montre que la réunion des deux fractions de la colonne de phénylsépharose ne permet pas de compléter l'extrait de cellules CTAG. L'activité peut avoir été détruite au cours de la purification. Cette perte d'activité peut s'expliquer par le protocole utilisé. Il faut d'abord dialyser les protéines pour les mettre dans un tampon convenant à la colonne de phénylsépharose, puis après la chromatographie, il faut dialyser de nouveau les fractions pour les mettre dans un autre tampon convenant à l'essai de répllication. Comme ces étapes de dialyse pouvaient être responsables de la perte d'activité de complémentation, nous avons effectué les deux dialyses, mais sans soumettre les protéines à la chromatographie sur la colonne de phénylsépharose, puis nous avons mesuré l'activité du dialysat. Comme on peut le voir dans la figure 13 à la page 41 (couloir 8), la dialyse n'est pas responsable de la perte de l'activité de complémentation.

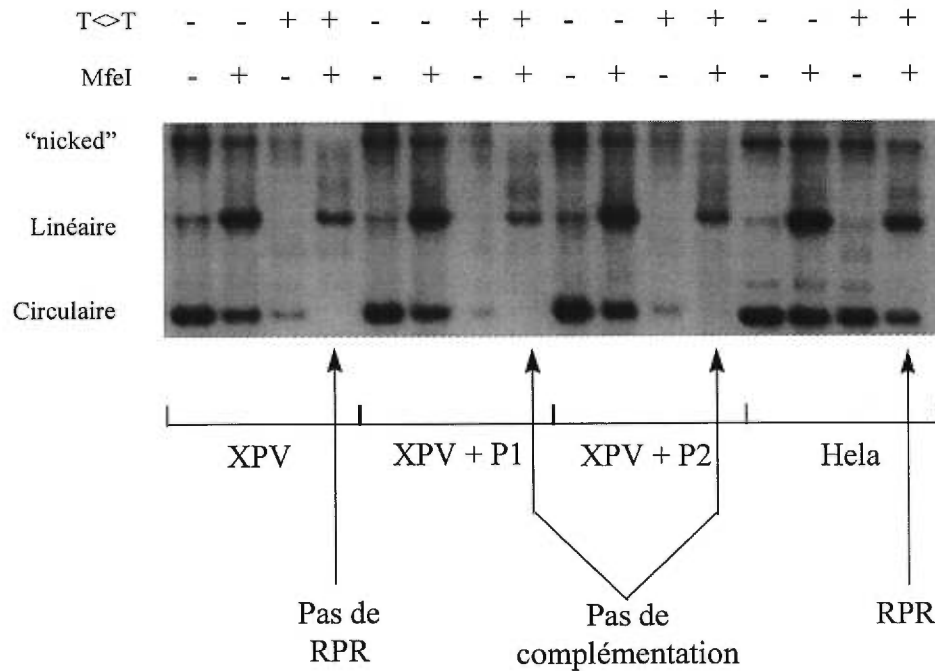


Figure 11: **Activité des fractions provenant de la colonne phénylsépharose**

Les différentes fractions obtenues de la colonne phénylsépharose sont mélangées en proportion égale à l'extrait de XPV avant de les tester dans l'essai de réplication. Après l'essai de réplication et la purification sur colonne Sépharose Cl 4B, les échantillons sont digérés avec MboI ainsi que DpnI et selon le cas, avec MfeI. Par la suite, la radioactivité de 5  $\mu$ l de chaque échantillon est comptée et les valeurs sont normalisées afin d'obtenir des volumes contenant des quantités équivalentes d'ADN. Les volumes normalisés d'ADN sont chargés sur un gel d'agarose 0.8% et le gel est migré 2 heures à 200 volts. Après la migration le gel est fixé 30 minutes à l'aide d'une solution contenant 10% méthanol et 10% acide acétique. Après un lavage de 15 min dans de l'eau distillée, le gel est séché dans un séchoir de gel d'acrylamide. Le gel est finalement exposé sur film et/ou sur phosphorimager.

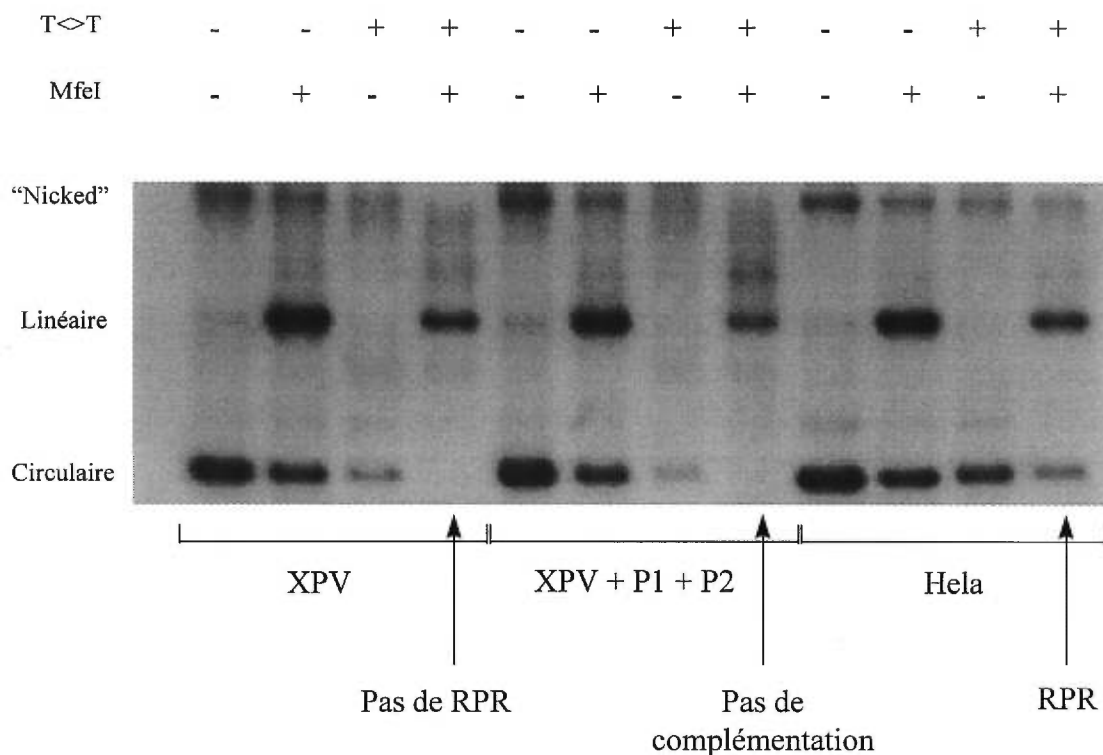


Figure 12: **Activité des fractions P1 et P2 combinées**

Les deux fractions obtenues de la colonne phénylsépharose (P1 et P2) sont remise ensemble et ajoutées en proportion égale à l'extrait de XPV avant de les tester dans l'essai de réplication. Après l'essai de réplication et la purification sur colonne Sépharose Cl 4B, les échantillons sont digérés avec MboI ainsi que DpnI et selon le cas, avec MfeI. Par la suite, la radioactivité de 5 ul de chaque échantillon est comptée et les valeurs sont normalisées afin d'obtenir des volumes contenant des quantités équivalentes d'ADN. Les volumes normalisés d'ADN sont chargés sur un gel d'agarose 0.8% et le gel est migré 2 heures à 200 volts. Après la migration le gel est fixé 30 minutes à l'aide d'une solution contenant 10% méthanol et 10% acide acétique. Après un lavage de 15 min dans de l'eau distillée, le gel est séché dans un séchoir de gel d'acrylamide. Le gel est finalement exposé sur film et/ou sur phosphorimager.



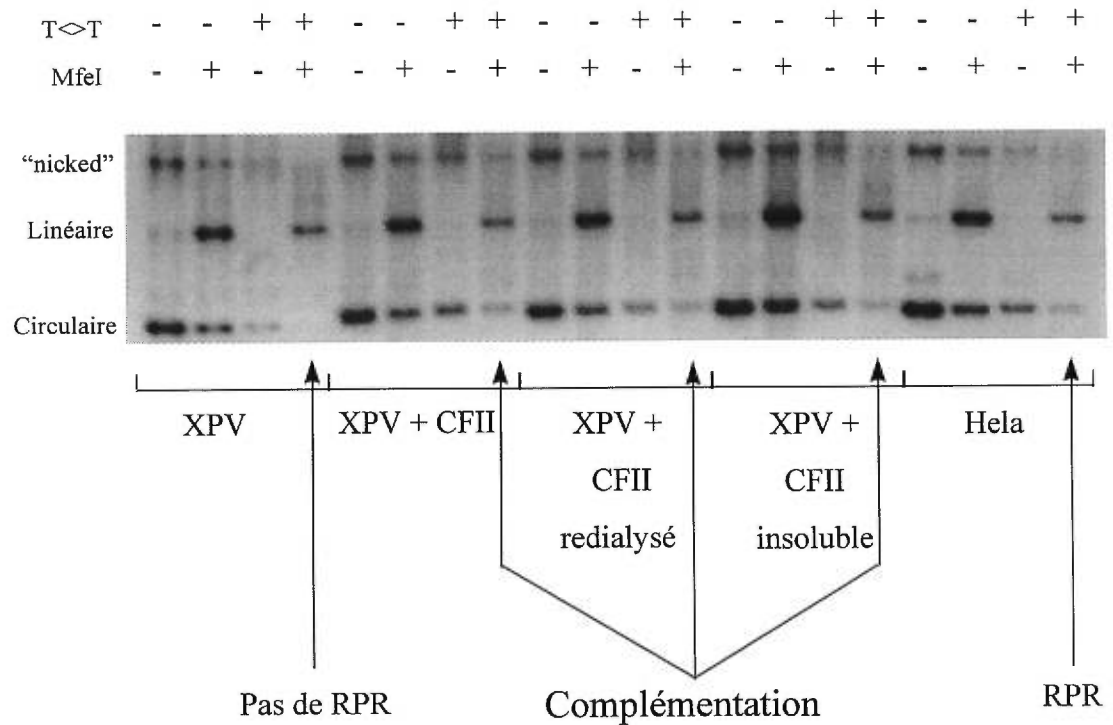


Figure 13: **Effet de la dialyse sur l'activité de la fraction CFII**

L'échantillon CFII avant les dialyses, la fraction CFII insoluble après la première dialyse ainsi que la fraction CFII après les deux dialyses sont mélangées respectivement avec XPV en proportion égales avant de les tester dans l'essai de réplication. La première dialyse consistait à mettre les protéines dans le tampon de départ pour la colonne phénylsépharose soit le tampon 50 mM de phosphate de sodium avec 1 M de sulfate d'ammonium. La seconde dialyse remettait les protéines dans le tampon compatible pour l'essai de réplication (Buffer H + 15 mM NaCl). La fraction insoluble consistait en un petit culot que l'on pouvait recueillir après la première dialyse. Cette petite fraction a été également soumise à la deuxième dialyse avant d'être testée dans l'essai de réplication. Après l'essai de réplication et la purification sur colonne Sépharose Cl 4B, les échantillons sont digérés avec MboI ainsi que DpnI et selon le cas, avec MfeI. Les volumes normalisés d'ADN sont chargés sur un gel d'agarose 0.8% et le gel est migré 2 heures à 200 volts. Après la migration le gel est fixé 30 minutes à l'aide d'une solution contenant 10% méthanol et 10% acide acétique. Après un lavage de 15 min dans de l'eau distillée, le gel est séché dans un séchoir de gel d'acrylamide. Le gel est finalement exposé sur film et/ou sur phosphorimager.

## DISCUSSION

Depuis les années 1960, les progrès ont été lents dans le domaine de la réparation post-répliationnelle. Ainsi, même après presque 40 ans, ce processus n'est toujours pas élucidé. Jusqu'à maintenant, c'est la levure qui nous a fourni le modèle eucaryote le plus avancé dans ce domaine. Toutefois, on est loin d'être sûr que ce qu'on trouvera chez la levure sera directement applicable à l'humain. Il faudra mettre au point des modèles mammaliens, ou mieux humains, pour être en mesure de comprendre le phénomène. Mon travail a consisté à jeter les bases d'une méthode permettant de purifier le ou les constituants intervenant dans les voies de RPR. Il s'agit d'un procédé qui allie la méthode relativement nouvelle de répliation de l'ADN renfermant l'origine de répliation SV40 et des méthodes biochimiques classiques de purification des protéines. Cette approche est longue, mais c'est le moyen le plus sûr d'atteindre notre objectif.

Les extraits de cellules CHO ne peuvent pas répliquer l'ADN renfermant l'origine de répliation du SV40 et sont donc difficiles à utiliser seuls. Nous avons montré que l'addition de polymérase-alpha-primase à l'extrait de cellules CHO ne suffit pas à rétablir l'activité de répliation dans ce système. Ce résultat ne nous a pas réellement surpris, car les cellules CHO ne sont pas permissives au virus SV40. Il est probable que plus d'une protéine est nécessaire pour qu'il y ait répliation du virus dans ces cellules. En outre, il est concevable que la polymérase-alpha-primase humaine n'interagisse pas du tout avec le système de répliation des cellules CHO.

La ou les protéines des cellules CHO qui interviennent dans la RPR peuvent toutefois agir sur le système de répliation humain et permettre le rétablissement de l'activité de RPR des extraits de cellules CTAG. Il est également possible d'utiliser moins de 25 % d'extrait de cellules CHO (par rapport à l'extrait cellulaire total) pour obtenir une complémentation. Nous n'avons pas déterminé quelle est la plus faible quantité de protéines de cellules CHO qui permet encore une complémentation.

L'extrait de cellules CHO-UV-1, comme l'extrait de cellules CHO, complémente l'extrait de cellules CTAG. Ce résultat est très intéressant dans la mesure où il confirme que ces deux lignées cellulaires ont un phénotype différent (l'une est hypomutable et l'autre est hypermutable). Elles sont donc assurément déficientes au niveau de deux voies différentes, ce qui confirme la présence de voies multiples chez les cellules mammaliennes, comme chez la levure. Ces résultats militent en faveur d'une théorie que j'élaborerai plus loin.

Le fractionnement de l'extrait de cellules CHO sur une colonne de phosphocellulose P-11 donne dans ce cas 3 fractions. Toute l'activité se retrouve dans la fraction CF II. Le fait que toute l'activité soit réunie dans une seule fraction nous indique que cette activité est spécifique d'une protéine ou d'un petit groupe de protéines. De plus, la fraction CF II ne correspond qu'à 25 % des protéines totales de l'extrait cellulaire original.

La tentative de purifier davantage la fraction CF II sur une colonne de phénylsépharose a échoué et aucune activité n'a été récupérée. Comme la dialyse n'est pas responsable de la perte d'activité, l'activité de la fraction CF II a pu être détruite dans la colonne. Il y a au moins deux explications possibles à cette perte d'activité : 1) le passage dans la colonne dénature la protéine ou 2) la protéine est si fortement liée à la colonne qu'elle n'est pas éluée, même en l'absence de sel dans le tampon. Dans ce dernier cas, s'il était possible de déloger la protéine de la colonne, on posséderait là un avantage certain, car la protéine serait pratiquement pure. Malheureusement, il faudrait beaucoup de temps pour déterminer si la protéine est vraiment fixée à la colonne et pour vérifier si elle peut être délogée. Même si on y parvenait, rien ne nous garantit que la protéine serait encore active. Par ailleurs, la même méthode de purification (chromatographie sur P-11, puis sur phénylsépharose) avec un extrait de cellules Hela a donné les mêmes résultats : aucune activité à la sortie de la colonne de phénylsépharose (résultats obtenus par une étudiante au PhD du laboratoire: Chunli Lei). Ces données indiquent que ce problème de purification n'est pas limité à l'extrait de cellules CHO et que la ou les protéines d'intérêt seraient similaires chez les cellules de rongeur et chez les cellules humaines. Nous devons donc conclure que la chromatographie sur

colonne de phénylsépharose n'est pas la technique à utiliser après la chromatographie sur colonne de phosphocellulose P-11.

Nous avons montré qu'il est possible de mesurer l'activité de RPR et que cette activité peut être purifiée par les méthodes courantes de purification des protéines. Il s'agit d'une méthode sûre pour isoler au moins une protéine intervenant dans la RPR. L'inconvénient de cette approche est que la purification des protéines est une tâche longue et ardue. L'autre solution, plus rapide, consisterait à continuer à caractériser les protéines du groupe épistatique RAD6 chez la levure. Toutefois, les résultats obtenus chez la levure ne seraient pas nécessairement applicables à l'humain. En fait, nos résultats montrent qu'aucune dégradation des protéines n'est nécessaire chez l'humain pour qu'il y ait synthèse translésion (en effet, on obtient une complémentation *in vitro* avec un extrait acellulaire). Il s'agirait donc d'une différence par rapport à la situation chez la levure (on pense que la protéine RAD6 ubiquitine certaines protéines arrêtées au niveau de la lésion de façon à provoquer leur dégradation par le protéasome) ou tout simplement d'une preuve que cette hypothèse est fautive. Une meilleure explication de l'activité de l'ubiquitine-conjugase de RAD6 serait que l'ubiquitination des histones peut modifier la configuration de l'ADN et exposer plus efficacement le site endommagé. Il vaut la peine de continuer la purification chez les cellules de mammifère; nul doute que le temps et les efforts consacrés à cette tâche finiront par être récompensés. Jusqu'à maintenant, la purification des protéines de la RPR a été limitée à une étape de chromatographie sur colonne échangeuse de cations (P-11). Nous suggérons d'utiliser une colonne échangeuse d'anions dans une deuxième étape de purification, puis une colonne de tamis moléculaire dans une troisième étape.

Notre connaissance actuelle du processus de RPR chez l'humain est très limitée. Toutefois, on peut établir une corrélation intéressante entre les données obtenues chez les organismes inférieurs et celles obtenues chez les cellules de mammifère. Chez les cellules de rongeur, comme chez les cellules XPV, le comblement des brèches dans l'ADN est sensible à la caféine. Le fait qu'il existe chez les mammifères une voie sensible à la caféine et une autre insensible à la caféine correspond bien avec les deux voies chez la levure et les bactéries

(éviter des lésions et synthèse translésion), l'évitement des lésions étant insensible à la caféine et la synthèse translésion étant sensible à la caféine. Une autre indication de l'existence de deux voies différentes chez les cellules de mammifère nous vient de la relation entre les cellules CHO-UV-1 (hypomutables) et les cellules XPV (hypermutables). Le fait que l'extrait de cellules CHO-UV-1 complète l'extrait de cellules XPV (figure 9 à la page 35) confirme qu'on est en présence de deux voies différentes de la RPR. Selon mon hypothèse, l'extrait de cellules CHO-UV-1 serait déficient au niveau de la synthèse translésion, alors que l'extrait de cellules XPV serait déficient au niveau de l'activité d'évitement des lésions. Cette hypothèse est fondée sur le fait que chez la levure, le principal mécanisme utilisé est l'évitement des lésions (sans erreur) et que la synthèse translésion (comportant des erreurs) est un mécanisme secondaire. Chez les cellules CHO-UV-1, la synthèse translésion serait inactif et toute l'activité de RPR viendrait de l'évitement des lésions (sans erreur), ce qui donne le phénotype hypomutable. Chez les cellules XPV, le mécanisme d'évitement des lésions serait inactif (du moins en partie) et le mécanisme de synthèse translésion (comportant des erreurs) serait la principale voie de RPR, ce qui expliquerait que les cellules XPV présentent un phénotype hypermutable. En ce qui concerne la sensibilité à la caféine dans ce modèle, presque toutes les pièces du puzzle sont à leur place. Les cellules "normales", comme les cellules Hela, sont insensibles à la caféine. Selon mon hypothèse, la caféine agit sur les protéines intervenant dans le mécanisme de synthèse translésion en bloquant leur activité. Dans les cellules normales, comme l'évitement des lésions est le principal mécanisme, une exposition à la caféine ne fait qu'inhiber la voie la moins utilisée (synthèse translésion). C'est exactement ce qu'on observe *in vivo* : les cellules traitées à la caféine ne présentent aucune activité ou, dans certaines conditions, ne présentent qu'une faible inhibition (25). Au contraire, les cellules XPV sont grandement influencées par la caféine, ce qui cadre bien avec cette hypothèse, car les cellules XPV ne peuvent qu'utiliser la voie de synthèse translésion. La raison pour laquelle les cellules CHO ont un mécanisme de RPR si actif est probablement qu'elles ont élaboré une voie de synthèse translésion qui agit aussi souvent et même plus souvent que la voie d'évitement des lésions. Ce qui expliquerait qu'elles soient également sensibles à la caféine. En ce qui

concerne les cellules CHO-UV-1, on s'attendrait d'après ce modèle à ce qu'elles soient insensibles à la caféine étant donné qu'elles sont déficientes au niveau de la synthèse translésion. C'est exactement ce qu'a trouvé le groupe de Waldren qui a élaboré et caractérisé cette lignée cellulaire (27, 78).

On connaît déjà quelques protéines qui jouent un rôle dans la RPR, mais une foule d'autres nous sont encore inconnues. Chez la levure, on peut déjà constater la complexité de ce mécanisme et on sait peu de choses sur les fonctions des protéines dans le groupe épistatique RAD6. On peut facilement imaginer la complexité du mécanisme chez l'humain car aucune protéine n'a encore été identifiée dans ce processus. On peut maintenant s'attaquer à l'élucidation des protéines et des gènes intervenant dans la RPR. Mais ce ne sera qu'au prix de beaucoup de temps et d'effort que nous pourrons comprendre comment ces mécanismes fonctionnent.

## RÉFÉRENCES

- 1) Ariga, H. & Sugano, S. (1983) Initiation of simian virus 40 DNA replication in vitro; *J. Virology* **48**(2): 481-491
- 2) Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1993) Current Protocols in Molecular Biology; *Current Protocols*, USA
- 3) Bailly, V., Lauder, S., Prakash, S. & Prakash, L. (1997) Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities; *J. Biol. Chem.* **272** (37): 23360-23365
- 4) Banerjee, S. K., Christensen, R. B., Lawrence, C. W. & LeClerc, J. E. (1988) Frequency and spectrum of mutations produced by a single cis-syn thymine-thymine cyclobutane dimer in a single-stranded vector; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8141-8145
- 5) Baynton, K., Bresson-Roy, A. & Fuchs, R. P. P. (1998) Analysis of damage tolerance pathways in *Saccharomyces cerevisiae*: a requirement for Rev3 DNA polymerase in translesion synthesis; *Mol. Cell. Biol.* **18** (2): 960-966
- 6) Belguise-Valladier, P. & Fuchs, R. P. (1995) N-2-aminofluorene and N-2 acetylaminofluorene adducts: the local sequence context of an adduct and its chemical structure determine its replication properties; *J. Mol. Biol.* **249**(5): 903-913
- 7) Bennett, R. J., Dunderdale, H. J. & West, S. C. (1993) Resolution of Holliday junctions by RuvC resolvase; *Cell* **74**: 1021-1031
- 8) Black, H. S., deGrujil, F. R., Forbes, P. D., Cleaver, J. E., Ananthaswamy, H. N., deFabo, E. C., Ullrich, S. E. & Tyrrell, R. M. (1997)

- Photocarcinogenesis: an overview; *J. Photoch. & Photobiol.-Biol.* **40**(1): 29-47
- 9) Bridges, B. A. & Woodgate, R. (1985) Mutagenic repair in *Escherichia coli*: products of the recA gene and of the umuD and umuC genes act at different steps in UV-induced mutagenesis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4193-4197
- 10) Burckhardt, S. E., Woodgate, R., Scheuermann, R. H. & Echols, H. (1988) UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: overproduction, purification, and cleavage by RecA; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1811-1815
- 11) Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Morin, B., Raoul, S., Ravanat, J. L. & Spinelli, S. (1997) Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage; *Biol. Chem.* **378**(11): 1275-1286
- 12) Carty, M. P., Hauser, J., Levine, A. S. & Dixon, K. (1993) Replication and mutagenesis of UV-damaged DNA templates in human and monkey cell extracts; *Mol. Cell. Biol.* **13**(1): 533-542
- 13) Carty, M. P., Lawrence, C. W. & Dixon, K. (1996) Complete replication of plasmid DNA containing a single UV-induced lesion in human cell extracts; *J. Biol. Chem.* **271**(16): 9637-9647
- 14) Christner, D. F., Lakshman, M. K., Sayer, J. M., Jerina, D. M. & Dipple, A. (1994) Primer extension by various polymerases using oligonucleotide templates containing stereoisomeric benzo[a]pyrene-deoxyadenosine adducts; *Biochemistry* **33**(47): 14297-14305
- 15) Connelly, B., Parsons, C. A., Benson, F. E., Dunderdale, H. J., Sharples, G. J., Lloyd, R. G. & West, S. C. (1991) Resolution of Holliday junctions *in vitro* requires the *Escherichia coli* RuvC gene product; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6063-6067



- 16) Cordeiro-Stone, M., Zaritskaya, L. S., Price, L. K. & Kaufmann, W. K. (1997) Replication fork bypass of a pyrimidine dimer blocking leading strand DNA synthesis; *J. Biol. Chem.* **272**(21): 13945-13954
- 17) Cox, M. M. & Lehman, I. R. (1987) Enzymes of general recombination; *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 229-262
- 18) Dean, F. B., Bullock, P., Murakami, Y., Wobbe, C. R., Weissbach, L. & Hurwitz, J. (1987) Simian virus 40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**(1): 16-20
- 19) Dunderdale, H. J., Benson, F. E., Parsons, C. A., Sharples, G. J., Lloyd, R. G. & West, S. C. (1991) Formation and resolution of recombination intermediates by *E. Coli* RecA and RuvC proteins; *Nature* **354**:506-510
- 20) Echols, H. & Goodman, M. F. (1991) Fidelity mechanisms in DNA replication; *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 477-511
- 21) Egelman, E. H. & Stasiak (1993) Electron microscopy of RecA-DNA complexes: two different states, their functional significance and relation to the solved crystal structure; *Micron* **24**: 309-324
- 22) Egelman, E. H. (1993) What do X-ray crystallographic and electron microscopic structural studies of the RecA protein tell us about recombination?; *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**: 189-197
- 23) Friedberg, E. C., Siede, W., Cooper, A. J. (1991) Cellular responses to DNA damage in yeast; *The molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces. Genome Dynamics, Protein synthesis, and Energetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 24) Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W. (1995) DNA repair and mutagenesis. *ASM press*, Washington, D. C.
- 25) Fujiwara, Y. & Kondo, T. (1974) Postreplication repair of ultraviolet damage to DNA in xeroderma pigmentosum, other human and mouse cells in culture; *J. Radiat. Res.* **15**(2): 81-89

- 26) Gentil, A., Le Page, F. & Sarasin A. (1997) The consequence of translesional replication of unique UV-induced photoproducts; *Biol. Chem.* **378**(11): 1287-1292
- 27) Hentosh, P., Collins, A. R., Correll, L., Fornace, A. J., Giacca, A. & Waldren, C. A. (1990) Genetic and biochemical characterization of the CHO-UV-1 mutant defective in postreplication recovery of DNA; *Cancer research* **50** (8): 2356-2362
- 28) Higgins, N. P., Kato, K & Strauss, B. (1976) A model for replication repair in mammalian cells; *J. Mol. Biol.* **101**: 417-425
- 29) Howard-Flanders, P., Rupp, W. D., Wilkins, B. M. & Cole, R. S. (1968) DNA replication and recombination after UV irradiation; *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **33**: 195-207
- 30) Johnson, R. E., Henderson, S. T., Petes, T. D., Prakash, S., Bankmann, M. & Prakash, L. (1992) Saccharomyces cerevisiae RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome; *Mol. Cell. Biol.* **12** (9): 3807-3818
- 31) Joiner, M. C., Lambin, P., Malaise, E. P., Robson, T., Arrand, J. E., Skov, K. A. & Marples, B. (1996) Hypersensitivity to very-low single radiation doses: its relationship to the adaptive response and induced radioresistance; *Mut. Res.* **358**(2): 171-183
- 32) Kaufmann, W. K. (1989) Pathways of human cell post-replication repair; *Carcinogenesis* **10**(1): 1-11
- 33) Koffel-Schwartz, N. & Fuchs, R. P. (1995) Sequence determinants for -2 frameshift mutagenesis at NarI-derived hotspots; *J. Mol. Biol.* **252**(5): 507-513
- 34) Koffel-Schwartz, N., Coin, F., Veaute, X. & Fuchs, R. P. P. (1996) Cellular strategies for accommodating replication-hindering adducts in DNA: control

- by the SOS response in *Escherichia coli*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7805-7810
- 35) Kowalczykowski, S. C. (1991) Biochemistry of genetic recombination: energetics and mechanism of DNA strand exchange; *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**: 539-575
- 36) Lawrence, C. (1994) The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it?; *Bioessays* **16** (4): 253-258
- 37) Lawrence, C. W. & Christensen, R. B. (1976) UV mutagenesis in radiation-sensitive strains of yeast; *Genetics* **82**: 207-232
- 38) Lawrence, C. W. & Christensen, R. B. (1978) Ultraviolet-induced reversion of *cyc1* alleles in radiation-sensitive strains of yeast. I. Rev1 Mutant strains; *J. Mol. Biol.* **122**: 1-21
- 39) Lawrence, C. W. & Christensen, R. B. (1979) Ultraviolet-induced reversion of *cyc1* alleles in radiation-sensitive strains of yeast. III. Rev3 mutant strains; *Genetics* **92**: 397-408
- 40) Lawrence, C. W. & Hinkle, D. C. (1996) DNA polymerase zeta and the control of DNA damage induced mutagenesis in eukaryotes; *Cancer Surveys* **28**: 21-31
- 41) Lawrence, C. W., O'Brien, T. & Bond, J. (1984) UV-induced reversion of *his4* frameshift mutations in *rad6*, *rev1*, and *rev3* mutants of yeast; *Mol. Gen. Genet.* **195**: 487-490
- 42) Lehmann, A. R. (1972) Postreplication repair of DNA in ultraviolet-irradiated mammalian cells; *J. Mol. Biol.* **66**: 319-337
- 43) Lehmann, A. R., Kirk-Bell, S., Arlett, C. F., Paterson, M. C., Lohman, P. H., De Weerd-Kastelein, E. A. & Bootsma, D. (1975) Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 219-223

- 44) Leiborwitz, E., Janniger, C. K., Schwartz, R. A. & Lambert, W. C. (1997) Xeroderma pigmentosum; *Cutis* **60**(2): 81-84
- 45) Li, J. J. & Kelly, T. J. (1984) Simian virus 40 DNA replication *in vitro*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**(22): 6973-6977
- 46) Li, J. J. & Kelly, T. J. (1985) Simian virus 40 DNA replication *in vitro*: specificity of initiation and evidence for bidirectional replication; *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1238-1246
- 47) Lloyd, R. G. & Sharples, G. J. (1991) Molecular organization and nucleotide sequence of the RecG locus of *Escherichia coli* K-12; *J. Bacteriol.* **173**: 6837-6843
- 48) Lloyd, R. G. & Sharples, G. J. (1993) Dissociation of synthetic Holliday junctions by *E. Coli* RecG protein; *EMBO J.* **12**: 17-22
- 49) Loft, S. & Poulsen, H. E. (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man; *J. Molec. Med.* **74**(6): 297-312
- 50) Maenhaut-Michel, G., Janel-Bintz, R. & Fuchs, R. P. P. (1992) A umuDC-independent SOS pathway for frameshift mutagenesis; *Mol. Gen. Genet.* **235**: 373-380
- 51) McKee, R. H. & Lawrence, C. W. (1979) Genetic analysis of gamma-ray mutagenesis in yeast. II. Allele-specific control of mutagenesis; *Genetics* **93**: 375-381
- 52) McKee, R. H. & Lawrence, C. W. (1979) Genetics analysis of gamma-ray mutagenesis in yeast. I. Reversion in radiation-sensitive strains; *Genetics* **93**: 361-373
- 53) Menichini, P., Mroczkowska, M. M. & Singer, B. (1994) Enzyme-dependent pausing during *in vitro* replication of O4-methylthymine in a defined oligonucleotide sequence; *Mut. Res.* **307**(1): 53-59
- 54) Milhe, C., Fuchs, R. P. & Lefevre, J. F. (1996) NMR data show that the carcinogen N-2-acetylaminofluorene stabilises an intermediate of -2

- frameshift mutagenesis in a region of high mutation frequency; *Europ. Jour. Biochem.* **235**(1-2): 120-127
- 55) Morgan, W. F., Day, J. P., Kaplan, M. I., McGhee, E. M. & Limoli, C. L. (1996) Genomic instability induced by ionizing radiation; *Rad. Res.* **146**(3): 247-258
- 56) Murakami, Y., Eki, T., Yamada, M., Prives, C. & Hurwitz, J. (1986) Species-specific *in vitro* synthesis of DNA containing the polyoma virus origin of replication; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**(17): 6347-6351
- 57) Murakami, Y., Wobbe, C. R., Weissbach, L., Dean, F. B. & Hurwitz, J. (1986) Role of DNA polymerase alpha and DNA primase in simian virus 40 DNA replication *in vitro*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**(9): 2869-2873
- 58) Napolitano, R. L., Lambert, I. B., Fuchs, R. P. P. (1997) SOS factors involved in translesion synthesis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5733-5738
- 59) Nelson, J. R., Lawrence, C. W. & Hinkle, D. C. (1996) Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein; *Nature* **382**: 729-731
- 60) Nelson, J. R., Lawrence, C. W. & Hinkle, D. C. (1996) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta; *Science* **272**: 1646-1649
- 61) Nunez, M. I., McMillan, T. J., Valenzuela, M. T., Ruiz de Almodovar, J. M. & Pedraza, V. (1996) Relationship between DNA damage, rejoining and cell killing by radiation in mammalian cells; *Radioth. & Oncol.* **39**(2): 155-165
- 62) Park, S. D. & Cleaver, J. E. (1979) Postreplication repair: questions of its definition and possible alteration in Xeroderma pigmentosum cell strains; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**(8): 3927-3931
- 63) Parsons, C. A. & West, S. C. (1993) Formation of a RuvAB-Holliday junction complex *in vitro*; *J. Mol. Biol.* **232**: 397-405
- 64) Parsons, C. A., Tsaneva, I., Lloyd, R. G. & West, S. C. (1992) Interactions of *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins with synthetic Holliday junctions; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5452-5456

- 65) Radding, C. M. (1981) Recombination activities of *E. coli* recA protein;  
*Cell* **25**(1): 3-4
- 66) Radding, C. M. (1991) Helical interactions in homologous pairing and strand exchange driven by RecA protein; *J. Biol. Chem.* **266**: 5355-5358
- 67) Rajagopalan, M., Lu, C., Woodgate, R., O'Donnell, M., Goodman, M. F. & Echols, H. (1992) Activity of the purified mutagenesis proteins UmuC, UmuD', and RecA in replicative bypass of an abasic DNA lesion by DNA polymerase III; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10777-10781
- 68) Reha-Krantz, L. J., Nonay, R. L., Day, R. S. & Wilson, S. H. (1996) Replication of 06-methylguanine-containing DNA by repair and replicative DNA polymerases; *J. Biol. Chem.* **271**(33): 20088-20095
- 69) Roca, A. & Cox, M. (1990) The RecA protein: structure and function;  
*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**: 415-456
- 70) Rupp, W. D. & Howard-Flanders, P. (1968) Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation; *J. Mol. Biol.* **31**: 291-304
- 71) Rupp, W. D., Wilde, C. E., Reno, D. L. & Howard-Flanders, P. (1971) Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*;  
*J. Mol. Biol.* **61**: 25-44
- 72) Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- 73) Schneider, C., Weissart, K., Guarino, L. A., Dornreiter, I. & Fanning, E. (1994) Species-specific functional interactions of DNA polymerase alpha-primase with simian virus 40 (SV40) T antigen require SV40 origin DNA;  
*Mol. Cell. Biol.* **14**(5): 3176-3185
- 74) Segal, S. & Khoury, G. (1981) The regulation of SV40 gene expression in nonpermissive cells; *Prog. In Clin. & Biol. Res.* **66 Pt B**: 409-415

- 75) Shinawaga, H., Iwasaki, H., Kato, T. & Nakata, A. (1988) RecA protein-dependent cleavage of UmuD protein and SOS mutagenesis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1806-1810
- 76) Singhal, R. K., Hinkle, D. C. & Lawrence, C. W. (1992) The REV3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is transcriptionally regulated more like a repair gene than one encoding a DNA polymerase; *Mol. Gen. Genet.* **236**: 17-24
- 77) Sommer, S., Knezevic, J., Bailone, A. & Devoret, R. (1993) Induction of only one SOS operon, umuDC, is required for SOS mutagenesis in *Escherichia coli*; *Mol. Gen. Genet.* **239**:137-144
- 78) Stamato, T. D., Hinkle, L., Collins, A. R. S. & Waldren, C. A. (1981) Chinese hamster ovary mutant UV-1 is hypomutable and defective in a postreplication recovery process; *Somatic Cell Genetics* **7** (3): 307-320
- 79) Stary, A. & Sarasin, A. (1997) Le xeroderma pigmentosum; *Presse medicale* **26**(40): 1992-1997
- 80) Stasiak, A. (1992) Three-stranded DNA structure: is this the secret of DNA homologous recognition?; *Mol. Microbiol.* **6**: 3267-3276
- 81) Sung, P., Prakash, S. & Prakash, L. (1990) Mutation of cysteine-88 in the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 protein abolishes its ubiquitin-conjugating activity and its various biological functions; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(7): 2695-2699
- 82) Svoboda, D. L. & Vos, J. M. (1995) Differential replication of a single, UV-induced lesion in the leading or lagging strand by a human cell extract: fork uncoupling or gap formation; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(26): 11975-11979
- 83) Svoboda, D. L., Briley, L. P. & Vos, J.-M. H. (1998) Defective bypass replication of a site-specific UV-induced leading strand thymine dimer in Xeroderma pigmentosum variant cell extract; *Cancer research*, in press
- 84) Szekeres, E. S. Jr., Woodgate, R. & Lawrence, C. W. (1996) Substitution of mucAB or rumAB for umuDC alters the relative frequencies of the two

- classes of mutations induced by a site-specific T-T cyclobutane dimer and the efficiency of translesion DNA synthesis; *J. Bacteriol.* **178** (9): 2559-2563
- 85) Thomas, D. C & Kunkel, T. A. (1993) Replication of UV-irradiated DNA in human cell extracts: evidence for mutagenic bypass of pyrimidine dimers; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7744-7748
- 86) Thomas, D. C., Veaute, X., Fuchs, R. P. & Kunkel, T. A. (1995) Frequency and fidelity of translesion synthesis of site-specific N-2-acetylaminofluorene adducts during DNA replication in a human cell extract; *J. Biol. Chem.* **270**(36): 21226-21233
- 87) Torres-Ramos, C. A., Prakash, S., Prakash, L. (1997) Requirement of yeast DNA polymerase delta in post-replicative repair of UV-damaged DNA; *J. Biol. Chem.* **272** (41): 25445-25448
- 88) Torres-Ramos, C. A., Yoder, B. L., Burgers, P. M. J., Prakash, S. & Prakash, L. (1996) Requirement of proliferating cell nuclear antigen in RAD6-dependent postreplicative DNA repair; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9676-9681
- 89) Tsaneva, I. R., Muller, B. & West, S. C. (1992) ATP-dependent branch migration of Holliday junctions promoted by the RuvA and RuvB proteins of *E. Coli*; *Cell* **69**: 1171-1180
- 90) Umezumi, K., Chi, N.-W. & Kolodner, R. D. (1993) Biochemical interactions of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded binding protein; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3875-3879
- 91) Velculescu, V. E. & El-Deiry, W. S. (1996) Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene; *Clin. Chem.* **42**(6 Pt 1): 858-868
- 92) Wang, T. H. & Wang, H. S. (1996) p53, apoptosis and human cancers; *J. Formosan Med. Ass.* **95**(7): 509-522



- 93) Wang, Y. -C., Maher, V. M. & McCormick, J. J. (1991) Xeroderma pigmentosum variant cells are less likely than normal cells to incorporate dAMP opposite photoproducts during replication of UV-irradiated plasmids; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7810-7814
- 94) Wang, Y. -C., Maher, V. M., Mitchell, D. L. & McCormick, J. J. (1993) Evidence from mutation spectra that the UV hypermutability of xeroderma pigmentosum variant cells reflects abnormal, error-prone replication on a template containing photoproducts; *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4276-4283
- 95) West, S. C., Cassuto, E. & Howard-Flanders, P. (1981) Mechanism of *E. coli* RecA protein directed strand exchanges in post-replication repair of DNA; *Nature* **294**(5842): 659-662
- 96) West, S. C., Cassuto, E. & Howard-Flanders, P. (1982) Postreplication repair in *E. coli*: strand exchange reactions of gapped DNA by RecA protein; *Mol. Gen. Genet.* **187**(2): 209-217
- 97) West, S. C., Countryman, J. K. & Howard-Flanders, P. (1983) Enzymatic formation of biparental figure-8 molecules from plasmid DNA and their resolution in *Escherichia coli*; *Cell* **32**: 817-828
- 98) Wobbe, C. R., Dean, F., Weissbach, L. & Hurwitz, J. (1985) In vitro replication of duplex circular DNA containing the simian virus 40 DNA origin site; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**(17): 5710-5714
- 99) Woodgate, R., Rajagopalan, M., Lu, C. & Echols, H. (1989) UmuC mutagenesis protein of *Escherichia coli*: purification and interaction with UmuD and UmuD'; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**(19): 7301-7305