

**Université de Montréal**

**Iip1, une protéine possédant un motif F-box, est impliquée dans le maintien de la  
stabilité des mitochondries**

**Par Pierre-Karl Fortier**

**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 Science (M. Sc.)**

**en biologie moléculaire**

**Novembre 2001**

**© Pierre-Karl Fortier, 2001**



QH

506

U54

2002

V.009

3008 440 4 1

**Université de Montréal**

**Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé :**

**Iip1, une protéine possédant un motif F-box, est impliquée dans le maintien de la  
stabilité des mitochondries**

**Présenté par :**

**Pierre-Karl Fortier**

**A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

**Elliot Drobetsky, Président-rapporteur**

**Dindial Ramotar, Directeur de recherche**

**Pierre Belhumeur, Membre du jury**

**Mémoire accepté le 14 janvier 2002**

### Sommaire (français, long) :

Pour se protéger des stress oxydants, les organismes procaryotes et eucaryotes ont développé des mécanismes de défense très conservés tel le système des thiorédoxines. Masson et Ramotar (1996) ont démontré que chez *Saccharomyces cerevisiae*, le gène *IMP2* était requis pour la résistance cellulaire à des agents oxydants. D'un autre côté, Uetz et al. (2000) ont publié qu'Iip1 (*IMP2 interacting protein 1*) interagissait *in vivo* avec Imp2 d'où notre hypothèse de recherche initiale voulant que ces deux protéines se retrouvent dans la même voie anti-oxydante.

Nos résultats démontrent clairement que tout comme *imp2*, les mutants de délétion pour le gène *iip1* sont sensibles à divers agents oxydants tel le peroxyde d'hydrogène. De plus, l'interaction protéine-protéine entre Iip1 et Imp2 fut réalisée *in vitro* avec succès appuyant ainsi notre hypothèse de départ. Cependant, des études de délétions et de complémentations semblent indiquer qu'Iip1p ferait partie d'une voie anti-oxydante qui serait différente de celle où interviendrait Imp2p.

De plus, l'absence d'Iip1p occasionne une perte d'ADN ainsi qu'une perte du gradient de protons dans les mitochondries. C'est cette instabilité au niveau des mitochondries qui empêcherait les mutants *iip1* de croître sur un milieu respiratoire. Enfin, Iip1p possède un motif F-box laissant sous-entendre qu'elle pourrait être impliquée dans l'ubiquitination de certaines protéines. Ce rôle potentiel d'Iip1p est appuyé par sa localisation cytoplasmique qui concorde avec celles de protéines impliquées dans l'ubiquitination telle Skp1. De plus, la protéine Imp2 possède un poids moléculaire inférieur chez les mutants *iip1*, indiquant qu'elle pourrait être modifiée différemment en l'absence d'Iip1.

Nous croyons qu'il est important de bien caractériser Imp2p ainsi que les protéines participant à sa régulation, car il a été démontré que cette protéine jouait un rôle dans la résistance à la bléomycine.

Mots clés : IMP2, IIP1 (YLR368w), interaction, stress oxydant, mitochondries, F-box, ubiquitination, bléomycine.

**Sommaire (anglais, court) :**

Ramotar et al. (1996) have demonstrated that the *Saccharomyces cerevisiae* *IMP2* gene, which encodes a transcriptional co-activator, is required for cellular resistance to oxidative agents. Recently, it was also demonstrated through two-hybrid screening that Imp2p interacts *in vivo* with Iip1p (*Imp2 interacting protein*) (Uetz et al. 2000).

In this study, we show that Imp2p interacts *in vitro* with Iip1p. In addition, we show that *iip1* mutants are as sensitive as *imp2* mutants to oxidative agents such as hydrogen peroxide. However, complementation tests suggest that Imp2p and Iip1p play a role in different pathways in response to oxidative stress. To understand the role of the interaction between these two proteins, we have characterized Iip1p. Our data reveal that Iip1p is implicated in mitochondrial DNA stability as *iip1* mutants exhibit mitochondrial DNA deletions.

Here, we discuss the possibility that Iip1 is a member of the family of proteins with an F-box motif and may interact with other cellular proteins to regulate their activity through protein modification.

Key words : IMP2, IIP1 (YLR368w), interaction, oxidative stress, mitochondria, F-box, ubiquitination.

## Table des matières :

<b><u>SOMMAIRE (FRANÇAIS, LONG) :</u></b>	<b>III</b>
<b><u>SOMMAIRE (ANGLAIS, COURT) :</u></b>	<b>V</b>
<b><u>TABLE DES MATIÈRES :</u></b>	<b>VI</b>
<b><u>Liste des figures :</u></b>	<b>IX</b>
<b><u>Liste des tableaux :</u></b>	<b>X</b>
<b><u>Liste des abréviations :</u></b>	<b>XI</b>
<b><u>REMERCIEMENTS :</u></b>	<b>XI</b>
<b><u>1. INTRODUCTION :</u></b>	<b>1</b>
<b><u>1.1 LES DÉRIVÉS RÉACTIFS OXYGÉNÉS ET LEURS SOURCES :</u></b>	<b>1</b>
<u>1.1.1 Sources endogènes :</u>	<b>1</b>
<u>1.1.2 Sources exogènes :</u>	<b>3</b>
<b><u>1.2 DOMMAGES CELLULAIRES CAUSÉS PAR LES DRO :</u></b>	<b>5</b>
<u>1.2.1 Dommages occasionnés aux protéines :</u>	<b>6</b>
<u>1.2.2 Dommages occasionnés aux lipides :</u>	<b>7</b>
<u>1.2.3 Dommages occasionnés à l'ADN :</u>	<b>8</b>
<u>1.2.4 Dommages occasionnés aux mitochondries chez <i>S. cerevisiae</i> :</u>	<b>10</b>
<b><u>1.3 LES SYSTÈMES DE DÉTECTION ET DE DÉFENSE CONTRE LE STRESS OXYDANT :</u></b>	<b>12</b>
<u>1.3.1 Système de détection et de détoxification des DRO chez <i>E. coli</i> :</u>	<b>12</b>
<u>1.3.2 Systèmes de détection du stress oxydant chez <i>S. cerevisiae</i> :</u>	<b>14</b>
<u>1.3.3 Les facteurs de transcription impliqués lors du stress oxydant chez <i>S. cerevisiae</i> :</u>	<b>16</b>

<u>1.3.4 Systèmes de défense non-enzymatique chez <i>S. cerevisiae</i> :</u>	18
<u>1.3.5 Systèmes de défense enzymatique chez <i>S. cerevisiae</i> :</u>	20
<u>1.6 IMP2 : UN FACTEUR DE TRANSCRIPTION IMPLIQUÉ LORS DU STRESS OXYDANT :</u>	21
<u>1.7 Iip1, UNE NOUVELLE PROTÉINE INTERAGISSANT AVEC IMP2P :</u>	24
<u>1.8 LES PROTÉINES F-BOX ET L'UBIQUITINATION :</u>	26
<u>1.9 PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS :</u>	28
<b>2. MATÉRIELS ET MÉTHODES :</b>	<b>30</b>
<u>2.1 SOUCHES ET MILIEUX DE CROISSANCES :</u>	30
<u>2.2 CONSTRUCTION DES SOUCHES MUTANTES ET DES PLASMIDES :</u>	30
<u>2.3 RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR) :</u>	34
<u>2.4 TRANSFORMATION DE PLASMIDES ET DÉLÉTION DE GÈNES DANS <i>S. CEREVISIAE</i> :</u>	34
<u>2.5 TRANSFORMATION ET EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE DANS <i>E. COLI</i> :</u>	35
<u>2.6 INDUCTION ET EXTRACTION DE PROTÉINES <i>S. CEREVISIAE</i> :</u>	36
<u>2.7 COLONNE DE PHÉNYL-SÉPHAROSE :</u>	36
<u>2.8 BUWARDAGE WESTERN :</u>	37
<u>2.9 PÉTRIS AVEC OU SANS GRADIENT DE CONCENTRATION:</u>	38
<u>2.10 MICROSCOPIE :</u>	39
<u>2.11 DÉCOMPTE DES COLONIES :</u>	39
<u>2.12 PROGRAMME INFORMATIQUE UTILISÉ:</u>	40
<b>3. RÉSULTATS :</b>	<b>41</b>
<u>3.1 IIP1P INTERAGIT SPÉCIFIQUEMENT AVEC IMP2P <i>IN VITRO</i> :</u>	41
<u>3.2 IIP1P EST IMPLIQUÉE DANS LE STRESS OXYDANT INDÉPENDAMMENT D'IMP2P :</u>	44
<u>3.3 LOCALISATION CELLULAIRE D'IIP1P :</u>	47
<u>3.4 IIP1P EST NÉCESSAIRE À LA CROISSANCE SUR UN MILIEU RESPIRATOIRE :</u>	49
<u>3.5 L'ABSENCE D'IIP1 CAUSE LA FORMATION DE <i>PETITE</i> :</u>	51
<u>3.6 LES MUTANTS <i>IIP1</i> ONT DES DÉFICIENCES MITOCHONDRIALES SÉVÈRES :</u>	54
<u>3.7 L'ÉTAT REDOX ET LE MÉTABOLISME DU FER NE SEMBLENT PAS AFFECTÉS CHEZ LES MUTANTS <i>IIP1</i> :</u>	56

	viii
<u>3.8 L'ABSENCE D'IIP1P NE SEMBLE PAS ALTÉRER L'UBIQUITINATION DES PROTÉINES :</u> -----	58
<b>4- DISCUSSION :</b> -----	<b>61</b>
<u>4.1 LES PROTÉINES IMP2 ET IIP1 INTERAGISSENT ENTRE ELLES :</u> -----	61
<u>4.2 LA PROTÉINE IIP1 EST ESSENTIELLE LORS DE STRESS OXYDANT :</u> -----	62
<u>4.3 LES MUTANTS IIP1 POSSÈDENT DES MITOCHONDRIES NON-FONCTIONNELLES :</u> -----	64
<u>4.4 EST-CE QU'IIP1 EST UNE PROTÉINE F-BOX ?</u> -----	66
<b>5- CONCLUSION :</b> -----	<b>70</b>
<b><u>6- BIBLIOGRAPHIE :</u></b> -----	<b>72</b>

## Liste des figures :

<i>Figure 1.1. La protéine Yap1 possède trois domaines distincts .....</i>	15
<i>Figure 1.2. Représentation schématique de la structure de la protéine Imp2 .....</i>	23
<i>Figure 1.3. Ubiquitination de Sic1p par le complexe SCF .....</i>	28
<i>Figure 2.1. Représentation des plasmides utilisés .....</i>	33
<i>Figure 3.1. Buvardage Western démontrant l'interaction in vitro entre Iip1p et Imp2p .....</i>	43
<i>Figure 3.2. Sensibilité du mutant iip1 et imp2 à un gradient d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....</i>	46
<i>Figure 3.3. Localisation cytoplasmique d'Iip1 fusionnée à la Gfp .....</i>	48
<i>Figure 3.4. Les mutants iip1 sont incapables de croître sur un milieu respiratoire .....</i>	50
<i>Figure 3.5. Les mutants iip1 ont le phénotype de petite .....</i>	52
<i>Figure 3.6. Les mutants iip1 ne possèdent pas de mitochondries fonctionnelles .....</i>	55
<i>Figure 3.7. Iip1p ne semble pas impliquée dans le maintien de l'état redox et le métabolisme du fer de la levure .....</i>	57
<i>Figure 3.8. Iip1p ne semble pas impliquée dans l'ubiquitination d'Imp2p et dans l'ubiquitination générale des protéines .....</i>	60
<i>Figure 4.1 Modèle de l'inactivation de l'activité d'Imp2p .....</i>	69

**Liste des tableaux :**

*Tableau 2.1. Souches de levures et de bactéries utilisées.....32*

*Tableau 3.1. Analyse comparative de la formation de petites colonies entre le type sauvage et le mutant *iip1* .....53*

**Liste des abréviations :**

ADN.....	acide déoxyribonucléique
ARN(t).....	acide ribonucléique (de transfert)
°C.....	degré celcius
Cm.....	centimètre
D.O.....	densité optique
DRO.....	dérivé réactif oxygéné
DTT.....	dithiotréitol
<i>E.coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
EDTA.....	acide éthylène diamine tréaacétique
g.....	gramme
GFP.....	protéine fluorescente verte
H <sub>2</sub> O.....	eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	peroxyde d'hydrogène
Kb.....	kilo paires de bases
KDa.....	kilo Dalton
L.....	litre
m.....	milli
M.....	molaire
MMS.....	méthyl méthane sulfonate
<i>mutant XΔ::LEU2</i> .....	mutant de délétion du gène X par insertion de la cassette <i>Leu2</i>
nm.....	nanomètre
ORF.....	cadre de lecture ouvert
Pb.....	paire de base
PCR.....	réactions de polymérase en chaîne
pI.....	point isoélectrique
RPM.....	rotations par minute
<i>S. cerevisiae</i> .....	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF.....	<u>S</u> kp1, <u>C</u> dc53, protéine <u>F</u> -box
Sec.....	seconde
μ.....	micro
Uv.....	ultra-violet

## **Remerciements :**

Ces travaux n'auraient jamais été complétés sans la supervision du Dr Dindial Ramotar, car en plus d'être mon directeur de recherche, il a su me motiver tout au long de ma maîtrise. C'est par nos discussions qu'il a su éveiller en moi un intérêt pour la recherche scientifique. J'espère que nous aurons encore l'occasion de battre le record de 4 litres de vin en une soirée lors du ou des prochains soupers de Noël.

J'aimerais aussi remercier mes parents de m'avoir encouragé et montré un grand intérêt pour mes recherches. Il n'y a tout simplement pas de mots pour décrire la gratitude que je leur dois.

Il y a bien sûr mes collègues de laboratoire à qui je dois beaucoup. Tout d'abord, Ratsavarinh Vongsamphanh pour m'avoir initié aux techniques du laboratoire dès mon arrivée au centre de recherche. Un merci aussi pour Jocelyn David pour m'avoir conseillé à quelques reprises et pour m'avoir gardé à jour dans ma littérature scientifique. Je dois aussi beaucoup de gratitude à Anick Leduc pour sa complicité qui a créé une synergie dans l'avancement de nos recherches. Son humour et celui d'Arshad Jilany m'ont certainement aidé à trouver moins longues les journées au centre de recherche. Il y a aussi les incontournables Angélique Aumont, Andra Shatilla, Xiaoming Xiang et Géraldine Mathonnet à qui je dois un gros merci pour leurs soutiens techniques.

Le succès d'une maîtrise ne se fait pas seulement en laboratoire et c'est pour cette raison que j'aimerais remercier particulièrement deux très chers amis : Dominique Jaar et David Mayrand. Leur curiosité pour le sujet de ma recherche m'a fait comprendre que la science ne devait pas être réservée seulement à une élite, mais plutôt faire l'objet d'un effort constant afin de la vulgariser.

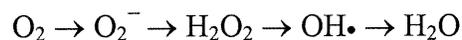
## **1. INTRODUCTION :**

### **1.1 Les dérivés réactifs oxygénés et leurs sources :**

Les cellules vivant dans un environnement aérobie doivent s'adapter à des conditions prooxidantes. En effet, l'oxygène est une molécule très réactive et lorsqu'elle est partiellement réduite, elle peut former des agents chimiquement réactifs appelés dérivés réactifs oxygénés (DRO). Les DRO sont très toxique car leurs électrons non appariés leur permettent de réagir avec plusieurs constituants de la cellule tels les protéines, les lipides et l'ADN. Les DRO les plus connus sont les ions hydroxyles (OH•) et l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ). Pour ce qui est du peroxide d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et de l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), ils ne sont pas considérés pas comme des vrais DRO parce ce qu'ils ne sont pas très réactif. Leurs toxicité viennent du fait qu'ils engendrent directement des DRO tel l'ion hydroxyles via diverses réactions.

#### **1.1.1 Sources endogènes :**

Il existe plusieurs sources de production de DRO endogènes, par exemple dans la chaîne respiratoire où se produit la réduction du dioxygène en eau, le cytochrome oxydase n'est pas totalement efficace et permet la génération d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , d'OH• et d' $\text{O}_2^-$  en catalysant la réaction suivante (Gutteridge, 1994):



L' $\text{H}_2\text{O}_2$  et l' $\text{O}_2^-$  produits lors de cette réaction ne sont pas très réactifs, mais ils peuvent se combiner et former le très réactif OH• selon la réaction d'Haber-Weiss :



La production de  $\text{OH}\cdot$  peut aussi être catalysée par plusieurs métaux tel le  $\text{Fe}^{2+}$



Il a été démontré que la réaction de Fenton est biologiquement importante, car les métaux contenus dans la chromatine pourraient catalyser la production de  $\text{OH}\cdot$  proche de l'ADN (Andronikashvili et al., 1974). La présence des métaux est aussi nécessaire au peroxyde d'hydrogène pour que celui-ci endommage l'ADN contrairement aux  $\text{OH}\cdot$ , qui sont capables d'interagir directement avec l'ADN (Blakely et al. 1990 et Joenje, 1989).

Un autre DRO mutagène et carcinogène capable d'endommager l'ADN directement, est l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ). Même s'il est moins réactif que  $\text{OH}\cdot$ , la demi-vie et la capacité de diffusion dans la cellule de l'oxygène singulet sont plus grandes (Joenje, 1989). Chez les cellules eucaryotes avancées, la génération d'oxygène singulet peut se produire lorsque des rayons ultra-violet excitent des molécules photosensibles tels les riboflavines, les porphyrines et les quinones. La molécule photosensible activée transmettra alors son énergie à une molécule réceptrice. Si la molécule réceptrice est de l'oxygène, il y aura génération d'oxygène singulet. Par contre, si la molécule réceptrice est un autre substrat, il y aura génération de radicaux libres (Foote, 1991).

Il existe plusieurs autres sources endogènes de DRO. On sait maintenant que chez les mammifères, le système immunitaire en génère comme agents anti-microbiens et anti-

viraux. Par exemple, à l'aide de la myéloperoxydase les neutrophiles convertissent l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en acide hypochloreux (HOCl) qui est considéré comme un agent oxydant puissant (Chanock et al., 1994). Finalement, plusieurs enzymes font partie de voies métaboliques cellulaires qui génèrent des DRO. La xanthine oxydase en est un bon exemple, car elle convertit la xanthine en acide urique tout en produisant du  $\text{H}_2\text{O}_2$  et du  $\text{O}_2^-$  (Aruoma et al., 1989).

### 1.1.2 Sources exogènes :

En plus de se défendre contre des DRO de sources endogènes les cellules sont souvent exposées à des sources externes ou exogènes d'agents oxydants. Des exemples bien connus sont les radiations ionisantes qui génèrent des  $\text{OH}\cdot$  par la radiolyse de l'eau et certains produits chimiques tel le paraquat, un pesticide produisant du  $\text{O}_2^-$  en prenant des électrons au NADPH (Kappus et Sies, 1981).

Une autre source exogène de DRO sont les xénobiotiques comme la mitomycine C et la bléomycine qui sont utilisées comme agents anti-tumoraux chez l'humain. Isolé de la souche *Streptomyces verticillus*, la bléomycine (BLM) fut découverte par Umezawa et al. (1966) comme étant un antibiotique glycopeptidique. Cet agent est encore utilisé sous le nom commercial de blenoxane pour guérir la maladie d'Hodgkin et les cancers de la tête, de la peau et des testicules (Sikic et al. 1985).

La bléomycine est une molécule de 1500 daltons constituée de quatre parties comprenant i) une partie amine terminale variante selon les isomères et qui interagit avec l'ADN, ii) une partie bithiazole nécessaire à la liaison de la bléomycine avec le sillon mineur de l'ADN, iii) une partie pseudopeptidique capable de lier à la fois des métaux et l'ADN et iv) une partie glycanique dont la fonction n'est pas encore claire (Mire et al. 1996). Afin de causer des dommages à la cellule, la bléomycine doit d'abord lier un métal tel le  $\text{Fe}^{2+}$ , le  $\text{Co}^{2+}$ , le  $\text{Zn}^{2+}$ , le  $\text{Ni}^{2+}$  ou le  $\text{Cu}^{2+}$ . Ensuite, ce complexe métal-bléomycine s'activera en liant un agent oxydant tel l'oxygène ou le peroxyde d'hydrogène (Burger, 1998).

Chez la levure, la bléomycine activée peut endommager la paroi cellulaire, certaines protéines, l'ARN et l'ADN (Lim et al., 1995). C'est d'ailleurs son affinité pour l'ADN qui rend la bléomycine si toxique pour la cellule car elle peut l'endommager de trois façons : en créant un site AP (apurinique/apirimidique), en créant une cassure simple brin ou en créant une cassure double brin. Par exemple, le complexe BLM-Fe(II)- $\text{O}_2$  qui constitue un DRO peut enlever un atome d'hydrogène du carbone 4' du déoxyribose de l'ADN qui, suite à des réarrangements, sera clivé ou produira un site AP (Burger, 1998). Bien entendu, les dommages causés à l'ADN par la bléomycine sont mutagène car elles entraînent des aberration chromosomique, des mutations et des transformation oncogéniques (Obe et al. 1992).

Enfin, nous savons que les eucaryotes et procaryotes peuvent se défendre de deux façons pour empêcher la bléomycine d'endommager la cellule i) en l'inactivant par une

liaison stoechiométrique avec une protéine ( les protéines Shble de *Streptoalloteichus hindustanus* et BlmA de *Streptomyces verticillus*) et ii) en l'inactivant par une protéine ayant une activité protéolytique (les bléomycines hydrolases Blh1 chez *S. cerevisiae* et hBH chez l'Humain) ou une activité d'acétyl transférase (BlmB de *Streptomyces verticillus*) (Gatignol et al. 1988, Sugiyama et al. 1994, Enenkel et Worf, 1993, et Ferrando et al., 1996)

### **1.2 Dommages cellulaires causés par les DRO :**

Comme le faisaient remarquer Newcomb et Loeb (1998), il est intéressant de quantifier le nombre de DRO produits par la respiration dans le but d'estimer les dommages cellulaires causés par ceux-ci. Les auteurs affirment qu'une cellule humaine est capable de métaboliser  $10^{12}$  molécules d'oxygène par jour générant ainsi  $3 \times 10^9$  molécules de  $H_2O_2$  par heure. Les DRO ainsi produits peuvent endommager 400 millions de moles de protéines et 14 millions de moles de transcrits d'ARN par jour. Pour ce qui est de l'ADN, Ames et Shigenaga (1992) ont estimé que chez une cellule humaine, il y avait environ  $2 \times 10^4$  lésions oxydantes par jour menant à un remplacement total de  $2 \times 10^5$  nucléotides. Étant donné que les DRO ont plusieurs cibles potentielles, il est primordial de mieux connaître la nature des dommages causés par les DRO si on veut comprendre la façon dont les cellules se défendent contre ceux-ci.

### 1.2.1 Dommages occasionnés aux protéines :

Les dommages des DRO aux protéines ont fait l'objet d'études approfondies et on sait désormais que l' $\text{OH}\cdot$  est le principal responsable des modifications faites aux protéines. Ces modifications sont l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés, la formation de protéines fusionnées et la fragmentation de protéines (Berlett et Stadtman, 1997). Seules les protéines ayant été oxydées peuvent être réduites par des protéines anti-oxydantes tel le glutathion, les protéines fusionnées ou fragmentées seront immédiatement dégradées par les protéosomes. Il est intéressant de noter que l'oxydation de certains acides aminés telles la lysine, l'arginine, la proline et la thréonine mène à la création de groupements carbonyles et que la présence de ces groupements a souvent été utilisée pour marquer et identifier les protéines oxydées (Levine et al., 1994). C'est en utilisant cette technique que Cabiscol et al. (2000) furent capables d'identifier les principales protéines sensibles aux stress oxydants. En phase aérobie, les protéines mitochondriales telles le pyruvate déshydrogénase, l' $\alpha$ -keto-glutarate déshydrogénase, l'aconitase et l'HSP 60 sont les principales protéines carbonylées. Les auteurs conclurent qu'en situation de stress oxydant, il était primordial pour la levure de diminuer la génération endogène de DRO en arrêtant la respiration mitochondriale et celle-ci y parvenait en synthétisant des protéines mitochondriales très sensibles à toutes variations du stress oxydant. L'oxydation des protéines a aussi été associée à divers phénomènes tel le vieillissement et à certaines pathologies tels la maladie d'Alzheimer, la dystrophie musculaire et le syndrome de Werner (Berlett et Stadtman, 1997).

### 1.2.2 Dommages occasionnés aux lipides :

Un autre type de dommage entraîné par les DRO est la peroxydation des lipides où un acide gras polyinsaturé sera dégradé en acide hydroperoxyde et en composés aldéhydes. S'ils ne sont pas réduits en composés non-toxique par les glutathions peroxydases, les lipides hydroperoxidés peuvent réagir avec des métaux pour produire des produits très réactif tel les époxydes. De leurs côté, les composés aldhéhyde comme le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (HNE) sont des substances mutagéniques chez la bactérie et l'humain et carcinogène chez le rat (Schauenstein et Esterbauer, 1978). En effet, il fut démontré chez *E. coli* que le MDA et HNE pouvaient directement réagir avec les purines et les pyrimidines de l'ADN causant ainsi des mutations dues à des changements de cadres de lectures et à des substitutions de paires de bases (Benamira et al. 1995 et Basu et al. 1993).

Les dommages causés par la peroxydation des lipides affectent aussi d'autres composantes cellulaires. Ils affectent les propriétés biophysiques de la membrane cellulaire comme la fluidité membranaire, la résistance électrique ainsi que l'homéostasie ionique (Richter, 1987 et Lebedev et al., 1982). En affectant ainsi l'intégrité membranaire, plusieurs phénomènes cellulaires sont perturbés tels l'activité des enzymes membranaires (Will, 1971) et l'homéostasie calcique (Orrenius et al., 1989). Enfin, la peroxydation des lipides est impliquée dans quelques pathologies comme le diabète (Kumar et al., 2001) et la maladie de Parkinson (Dexter et al., 1989).

### 1.2.3 Dommages occasionnés à l'ADN :

Les DRO endommagent aussi les acides nucléiques (ARN et ADN). Cependant, les dommages faits à l'ADN retiennent beaucoup plus l'attention, car il existe plusieurs copies d'une même séquence d'ARN capables de compenser pour une copie endommagée. D'un autre côté, il n'existe qu'une ou deux copies d'ADN chez les cellules eucaryotes et lorsque celui-ci est endommagé, l'intégrité de l'information qu'il contient est compromise. On a jusqu'à ce jour identifié 60 modifications possible de l'ADN par le seul ion hydroxyle (Breen et Murphy, 1995). Ces modifications forment 5 groupes incluant les brisures d'ADN simple brin ou double brin, les modifications de bases, les sites abasiques et les enchaînement de bases (cross-link) (Dizdaroglu, 1991). Les conséquences de l'oxydation des bases de l'ADN peuvent varier selon le type de dommage. Par exemple, il fut démontré chez *E. coli* que la base oxydée thymine glycol bloque la synthèse d'ADN, qu'elle est très peu mutagénique mais qu'elle est létale (Boiteux, 1993). D'un autre côté, les bases modifiées 8-oxoguanine sont extrêmement mutagénique (transversion GC → AT), mais ne causent pas l'arrêt de la synthèse de l'ADN et ne sont pas léthaux (Moriya et Grollman, 1993).

Il existe plusieurs voies que la cellule peut emprunter pour réparer sont ADN : la réparation par excision de bases, par excision de nucléotides, par mauvais appariement de bases, par recombinaison (Dizdaroglu, 1991). La voie de réparation de l'ADN par excision de base (BER) est de loin la plus importante lorsqu'il y a des bases oxydées même si un rôle de réparation mineur à été attribué à la voie par excision de nucléotides

(NER). La voie du NER comprenant environ 25 protéines chez les mammifères et répare préférentiellement les dommages qui provoquent une distorsion de l'hélice de l'ADN comme par exemple les ultra-violets, la cisplatine et le gaz moutarde (nitrogen mustard).

Dans la voie BER, les bases oxydées sont d'abord reconnues par des glycosylase à ADN comprenant Nth, Nei, Fpg et MutY chez *E. coli*, Ogg1, Ntg1 et Ntg2 chez *S. cerevisiae* et hOgg1 et hOgg2 chez l'humain. Les glycosylase à ADN ont comme rôle de reconnaître les bases modifiées comme les 8-oxoguanines et de cliver le lien glycopeptidique liant la base à son sucre. Enfin, une AP Endonucléase viendra enlever le 3' déoxyribose afin de permettre à une polymérase à ADN de resynthétiser la base (pour résumé lire Girard et Boiteux, 1997).

Comme il fut mentionné, les DRO tels la bléomycine activée ou les rayons ultra-violets, peuvent produire des brisures double brins dans l'ADN génomique. Afin de réparer ces brisures double brins extrêmement léthaux, les cellules eucaryotes ont développés des mécanismes de recombinaison homologue et non-homologue afin de réparer ces dommages. Chez *S. cerevisiae*, la recombinaison homologue est favorisée. Ce processus fait intervenir les protéines Rad52 (une protéine liant les fins d'ADN), Rad51 (forme des filament autour de l'ADN torsadé), une polymérase à ADN, la ligase à ADN I ainsi que d'autres protéines moins bien caractérisées. De leur côté, les cellules de mammifères préfèrent la réparation non homologue faisant intervenir les complexes Ku-ADN-PKcs (lie les fins d'ADN), Rad50-Mre11-Nbs1 et Xrcc4-ligase à ADN IV (pour résumé lire Featherstone et Jackson, 1999).

#### 1.2.4 Dommages occasionnés aux mitochondries chez *S. cerevisiae* :

Le génome des mitochondries est présent en une cinquantaine d'exemplaires dans chaque levure *S. cerevisiae* et mesure environ 80 kilobases. Il code pour plusieurs protéines, comme par exemple des sous-unités d'ATP synthase (Atp6) et divers ARNt qui sont essentiels au maintien de l'intégrité mitochondriale. Il n'est donc pas surprenant que plusieurs mutations dans le génome mitochondrial peuvent empêcher la levure de tirer son énergie de la respiration cellulaire. Ne pouvant plus respirer, ces levures ne peuvent plus croître sur un milieu respiratoire composé soit de glycérol ou soit d'éthanol qui nécessite des mitochondries fonctionnelles. Cependant, ces levures pourront croître sur un milieu fermentaire normal composé de dextrose. Cette croissance se fera plus lentement qu'une souche de levures sauvages occasionnant la formation de petites colonies d'où le phénotype nommé *petite*. Comparativement au type sauvage ( $\rho^+$ ), il existe plusieurs types de *petites*, la souche mutée peut être encore capable de synthétiser certaines protéines mitochondriales ( $\text{mit}^-$ ), en être incapable mais encore posséder des fragments d'ADN mitochondrial ( $\rho^-$ ) ou simplement ne plus posséder d'ADN mitochondrial ( $\rho^0$ ). Dans les deux derniers cas ( $\rho^-$  et  $\rho^0$ ), il ne reste tout au plus que des fragments de mitochondries donnant une petite taille aux levures d'où le phénotype de *petite cytoplasmique*. Il n'y a pas seulement que des mutations au niveau de l'ADN des mitochondries qui causent l'apparition de *petites*, car jusqu'à ce jour, plus de 100 gènes nucléaires pouvant influencer l'état du génome mitochondrial ont été identifiés (Contamine et Picard, 2000).

Il est très intéressant de voir comment le stress oxydant est impliqué dans la formation de *petites*. Les DRO générés lors de la respiration mitochondrial endommagent constamment l'ADN engendrant spontanément la formation de *petites* chez la levure de type sauvage. De plus, l'inactivation de plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans des voies anti-oxydantes entraîne la formation de *petites*. C'est le cas du gène GSH1 qui code pour la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase et qui est nécessaire à la synthèse du glutathion. L'absence de GSH1 entraîne la formation de *petites*, mais ce phénotype peut être prévenu si le mutant est en présence d'agents réducteurs tels le glutathion ou le DTT (dithiothréitol) (Grant et al., 1996).

Il existe d'autres exemples de protéines qui ne semblent pas faire partie directement d'une voie anti-oxydante mais qui sont essentielles au maintien de la stabilité de l'ADN mitochondrial. C'est le cas de la protéine Yfh1 (*yeast frataxin homologue*), dont le rôle précis est inconnu, mais qui est impliquée dans l'homéostasie du fer et dont l'absence entraîne la formation de *petites rho*<sup>o</sup>. La délétion de *yfh1* entraîne une augmentation de la concentration mitochondriale du fer dix fois plus importante que chez la souche sauvage (Babcock et al., 1997). L'hypothèse la plus retenue pour expliquer le phénotype de *petite* en l'absence de Yfh1p, est que le fer endommage l'ADN mitochondrial en augmentant la production de DRO par la réaction de Fenton. Il est aussi important de retenir que ce ne sont pas toutes les altérations dans le métabolisme du fer qui entraînent la formation de *petites*.

### **1.3 Les systèmes de détection et de défense contre le stress oxydant :**

La réponse cellulaire lors d'un stress oxydant peut se diviser en plusieurs étapes distinctes. En premier lieu, la cellule doit être en mesure de détecter la nature du stress (par exemple : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou bléomycine) et son intensité. Ensuite, la cellule change le patron d'expression des gènes en modulant l'activité de divers activateurs et répresseurs de transcription. Les nouvelles protéines ainsi traduites seront responsables de plusieurs phénomènes tels la réparation des constituants cellulaires endommagés ou l'élimination du stress par les systèmes de défenses enzymatiques et non-enzymatiques.

#### **1.3.1 Système de détection et de détoxification des DRO chez *E. coli* :**

Chez *E. coli*, un stress oxydant engendré par l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> ou par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être détecté par deux facteurs de transcription soit SoxR et OxyR. Pour ce qui est du facteur SoxR, on sait que l'oxydation de deux centres Fers-soufres sensibles au potentiel redox modifie sa structure et induit son activité transcriptionnelle (Gaudu et al. 1997). SoxRp induira la transcription du gène SOXS qui à son tour induira la transcription des gènes codant pour les protéines SodA (manganèse superoxyde dismutase), Fpr (ferredoxine/flavodoxine-NADP<sup>+</sup> réductase), Zwf (glucose 6-phosphate déhydrogénase), FumC (fumarase C), Nfo (endonucléase IV) et AcnA (aconitase A) (pour résumé lire Demple, 1996).

D'un autre côté, le facteur de transcription OxyR sera activé seulement lors de l'oxydation des cystéines 199 et 208 formant ainsi un lien disulfure entre ces deux acides

aminés (Zheng et al., 1998). Une fois activé, OxyRp activera plusieurs gènes dont les protéines ont des propriétés anti-oxydantes tel KatG (hydroperoxydase I), AhpCF (alkalhydroperoxydase), GorA (glutathione réductase) et GrxA (glutarédoxine). Lorsqu'il n'y a plus de stress oxydant, OxyRp est désactivée par la réduction des cystéines 199 et 208 par l'activité des protéines glutarédoxines et des thiorédoxines. Étant donné que GORA et GRXA sont régulées par OxyRp, la réponse au stress oxydant par oxyRp se régule d'elle-même.

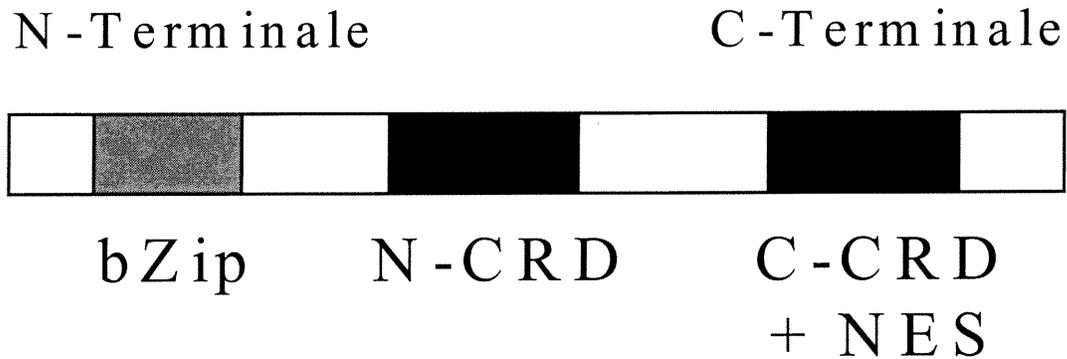
Il existe deux principaux systèmes anti-oxydants chez *E. coli*, soit les systèmes des thiorédoxines (Trxs) et des glutarédoxines (Grxs) qui sont des polypeptides capables de céder des molécules d'hydrogènes. La différence entre les deux systèmes provient de la façon dont les polypeptides sont réduits, même si ultimement, c'est le NADPH qui leur procure l'hydrogène nécessaire à leurs réductions. En effet, le système des thiorédoxines de *E. coli* contient deux thiorédoxines (Trx1 et Trx2) et une flavoprotéine réductase. De son côté, le système des glutarédoxines est composé trois glutarédoxines (Grx1, Grx2 et Grx3), une glutathion réductase et du glutathion (pour résumé lire Holmgren, 1989). Ces systèmes sont très bien conservés chez la levure et l'homme et seront décrits ultérieurement.

Enfin, il existe un dernier réducteur potentiel chez *E. coli*, il s'agit de la protéine NrdH-rédoxine qui possède une activité semblable aux thiorédoxines tout en ayant une séquence en acides aminés homologue à la glutarédoxine (Jordan et al., 1997). Même si le rôle physiologique exacte de la NrdH-rédoxine demeure inconnu, il fut démontré que

cette protéine pouvait être un donneur d'hydrogène pour la protéine ribonucléase réductase (Jordan et al., 1996).

### **1.3.2 Systèmes de détection du stress oxydant chez *S. cerevisiae*:**

Même si la majorité des mécanismes de détection du stress oxydant sont encore inconnus chez *S. cerevisiae*, il fut démontré comment le facteur de transcription Yap1p détecte les stress oxydants causés par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et le diamide. Yap1p fait partie de la famille AP-1 qui regroupe les facteurs de transcription du type bZip tels c-Fos et c-Jun chez les mammifères ainsi que les protéines Yap2 à Yap8 et Gcn4 chez *S. cerevisiae* (Fernandes et al., 1997). La structure de la protéine Yap1 consiste en un motif de leucines reconnues pour être responsable des interactions protéines-protéines, de deux domaines riches en cystéines (CRD) localisés en C- et en N-terminale et d'un domaine d'exportation nucléaire (NES) situé dans le CRD en C-terminale (figure 1.1) (Toone et al., 2001).



**Figure 1.1. La protéine Yap1 possède trois domaines distincts.**

La portion N-terminale est constituée d'un domaine bZip responsable d'interaction protéine-protéine. Deux domaines riches en cystéines (CRD) en N- et en C-terminale sont responsables de détecter certains stress oxydants. Le signal d'exportation nucléaire (NES) situé dans le domaine C-CRD peut seulement être reconnu par Crm-1 lorsque que Yap1p est dans un état réduit.

Lorsque la levure n'est pas soumise à un stress oxydant, Yap1p se localise au niveau du cytoplasme à cause de son exportation rapide du noyau par Crm1p qui fait partie de la famille des  $\beta$ -karyophérines et qui reconnaît spécifiquement les séquences NES (Yan et al., 1998). Cependant, lors d'un stress oxydant, la protéine Yap1 se localise davantage au niveau du noyau car elle n'interagit plus avec Crm1p. La cause serait due à l'oxydation des cystéines Cys598 et Cys620 de Yap1p créant ainsi des ponts disulfures dans le domaine C-CRD (Kuge et al., 2001). Ce réarrangement structural de Yap1p masquerait le NES empêchant Crm1p de s'y lier et d'exporter Yap1p hors du noyau (Kuge et al., 1998). L'oxydation des cystéines du domaine N-CRD est aussi nécessaire au maintien de la localisation nucléaire de Yap1p (Kuge et al., 2001). Lorsqu'il n'y a plus de stress oxydant, il semble que la protéine Yap1 pourrait être réduite par le système des thiorédoxines lui permettant d'être relocalisée au niveau du cytoplasme par Crm1p (Delaunay et al., 2000). Il est aussi intéressant de noter que dans ce modèle, Yap1p peut être activée différemment selon le type de stress oxydant rencontré. En effet, il fut démontré que l' $H_2O_2$  et la diamide moduleraient de façon non-identique l'activité de Yap1p en oxydant différentes cystéines (Delaunay et al., 2000).

### **1.3.3 Les facteurs de transcription impliqués lors du stress oxydant chez *S. cerevisiae*:**

Contrairement à la détection, la régulation de l'expression génétique lors de stress oxydant a été beaucoup plus étudiée. Si on prend encore l'exemple de Yap1p, il fut démontré que cette protéine régule l'expression d'au moins 70 gènes lors d'un traitement

au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gasch et al., 2000). Yap1p modulerait l'activité de plusieurs gènes en liant des séquences ARE (*AP-1 Response Element*) situées dans leurs promoteurs. Ce facteur de transcription est capable d'augmenter l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines ayant des fonctions anti-oxydantes (Sod1, Twf, Trx2, Glr1 et Gsh1) (pour un résumé voir Jamieson, 1998). Yap1p augmenterait aussi la transcription de gènes favorisant la voie métabolique des pentoses phosphates qui est responsable de générer beaucoup de composés réducteurs tels le NADH et le NADPH. Enfin, Yap1p serait responsable d'un ralentissement de la synthèse de l'ADN et donc du cycle cellulaire en inhibant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de nucléotides tels *GLY1*, *SHM2*, *RNR3* et *RNR4* (Dumond et al., 2000).

Il existe plusieurs autres types de facteurs de transcription qui ont un rôle important lors de stress oxydant. C'est le cas d'Ace1 qui est un facteur de transcription de type *copper-binding* et qui est en partie responsable de l'expression de *SOD1* (une superoxyde dismutase) et *CUP1* (une métallothionéine anti-oxydante) (Gralla et al., 1991). Un second exemple serait illustré par les protéines Msn2 et Msn4 qui sont des facteurs de transcription de type doigt de zinc liant spécifiquement la séquence STRE (*STress Responsive Element*) située dans le promoteur de gènes intervenant lors de divers stress. Il fut démontré que les protéines Msn2 et Msn4 étaient impliquées dans les réponses aux stress osmotique, thermique et oxydant en activant l'expression plusieurs gènes important tels *CTTI* (catalase T), *TPS2* (tréhalose phosphatase), *GSY2* (glycogène synthase) et *GPH1* (glycine amidinotransférase) (Martinez-Pastor et al., 1996). La modulation de l'activité transcriptionnelle par les facteurs de transcription permet à la

cellule de développer deux systèmes de défense qui seront composés de courts polypeptides ou d'enzymes ayant des fonctions anti-oxydantes.

#### 1.3.4 Systèmes de défense non-enzymatique chez *S. cerevisiae* :

Le facteur non-enzymatique le plus important est le glutathion (GSH) qui est un tripeptide ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cystinylglycine) dont le rôle est de réduire les oxydants par son groupement sulphydryl entraînant la formation de glutathions réduits (GSSG). D'autres rôles ont aussi été reconnus au glutathion comme la détoxification de drogues et le repliement des protéines (Sharma et al., 2000). Les gènes impliqués dans la synthèse du glutathion ont été identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* et il s'agit de *GSH1* ( $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase) et *GSH2* (glutathione synthétase) dont les mutants de délétions sont sensibles au stress oxydant. De plus, le mutant *gsh1* a le phénotype de *petite* suggérant que le glutathion joue un rôle important dans la protection des mitochondries face au stress oxydant produit par la respiration cellulaire (Lisowsky, 1993).

Un autre facteur non-enzymatique important pouvant partiellement compléter un mutant *gsh1* chez *S. cerevisiae*, est la thiorédoxine (Sharma et al., 2000). Les thiorédoxines (Trx) sont de petits polypeptides ayant une séquence conservée (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys) dans leur site actif. Lorsque la thiorédoxine est réduite (Trx-(SH)<sub>2</sub>), les deux cystéines sont capables de catalyser la réduction de groupements disulfures de certaines protéines ainsi que dégrader certains DRO tel l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une fois oxydées, les

thiorédoxines (Trx-S<sub>2</sub>) peuvent être réduites par le NADPH par l'action d'une enzyme nommée thiorédoxine réductase (Trr) (Pedrajas et al., 1999).

Chez *S. cerevisiae*, il existe deux systèmes de thiorédoxines : un situé dans le cytoplasme, composé d'une thiorédoxine réductase (Trr1) et de deux thiorédoxines (Trx1 et Trx2) et un deuxième situé dans les mitochondries, composé d'une thiorédoxine réductase (Trr2) et d'une thiorédoxine (Trx3) (Pedrajas et al., 1999). En plus de son rôle protecteur contre le stress oxydant, on sait que les thiorédoxines peuvent être des donneurs d'électrons pour plusieurs enzymes tel la ribonucléotide réductase et ce, autant chez *E. coli* que chez les mammifères (Holmgren et Bjornstedt, 1995). Chez les eucaryotes supérieurs, les thiorédoxines ont un rôle à jouer dans le repliement des protéines contenant des liens disulfures (Lundstrom et Holmgren, 1990), dans l'activation du récepteur de l'interleukine 2 (Tagaya et al., 1989), dans la modulation de certains facteurs de transcription tel NF- $\kappa$ B (Matthews et al., 1992) et dans la prolifération de cellules lymphoïdes (Wakasugi et al., 1990).

Finalement, on connaît d'autres mécanismes de défense anti-oxydant et non-enzymatique tel les polyamines, les métallothionines et les flavohaemoglobines chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'acide ascorbique chez les plantes et les glutarédoxines chez la majorité des eucaryotes (Jamieson, 1998).

### 1.3.5 Systèmes de défense enzymatique chez *S. cerevisiae* :

Il existe aussi plusieurs protéines possédant des activités enzymatiques et qui sont impliquées dans la détoxification des DRO et la réparation des composants cellulaires oxydés. Parmi ceux-ci on retrouve diverses catalases (Cta1 et Ctt1) qui sont responsables de la dégradation du  $H_2O_2$  en  $O_2$  et en  $H_2O$  et les superoxydes dismutases (Sod1 et Sod2) dont le rôle est de produire du  $H_2O_2$  et du  $O_2$  à partir de deux molécules d' $O_2^-$ . Essentiel au système du glutathion, le glutathion réductase (Glr1) a comme rôle de maintenir le ratio GSH/GSSG dans la cellule en réduisant le glutathion oxydé. Quant au glutathion peroxydase (Gpx1), il utilise le GSH comme source d'électron pour réduire l' $H_2O_2$  (Jamieson, 1998).

Un autre type d'enzyme intervenant lors de stress oxydants sont les thiorédoxines réductases. La thiorédoxine réductase 1 (Trr1) fut au départ isolée pour sa capacité à réduire une thiorédoxine peroxydase (Tsa1) en présence de thiorédoxines. On sait maintenant que Trr1 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que dans la réponse au stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène (Machado et al., 1997). Contrairement à Trr1 qui se localise au niveau du cytoplasme, Trr2 est plutôt localisée dans les mitochondries et son rôle est de protéger la levure des stress oxydants occasionnés par la respiration cellulaire (Pedrajas et al., 1999).

### **1.6 Imp2 : Un facteur de transcription impliqué lors du stress oxydant :**

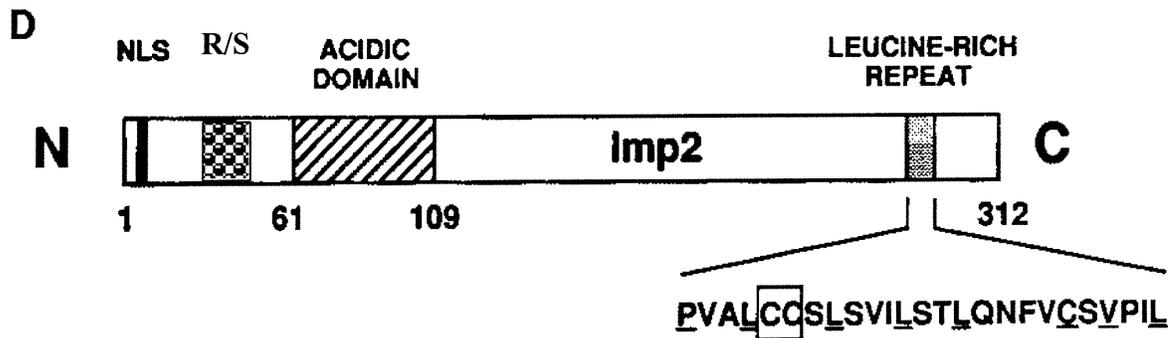
Il existe un autre facteur de transcription nommé Imp2 qui intervient dans plusieurs types de stress tels thermiques ou ioniques, mais dont le rôle lors des stress oxydants est jusqu'à présent inconnu.

Le gène *IMP2* fut d'abord isolé en 1992 par l'équipe de Donnini (1992) pour son implication dans le métabolisme du galactose, du maltose et du raffinose. En effet, le mutant *imp2* est incapable de croître sur ces milieux lorsqu'on inactive ses mitochondries à l'érythromycine par exemple. Plus précisément, Imp2p serait impliquée dans la régulation d'enzymes appartenant aux voies cataboliques du galactose, du maltose, du raffinose et de l'éthanol en l'absence de glucose. Imp2p agirait au niveau de la transcription et activerait les gènes codant pour la maltase, la maltose perméase, la galactose perméase et serait possiblement un répresseur de la NAD-dépendante glutamate déhydrogénase (Lodi et al., 1995) Il fut aussi noté que les levures déficientes en Imp2p avaient une faible croissance sur des milieux respiratoires, une sensibilité aux chocs thermiques et une sporulation déficiente (Donnini et al., 1992).

En 1996, le gène *IMP2* fut isolé de nouveau, car les mutants *imp2* étaient sensibles à la bléomycine (Masson et Ramotar, 1996). Il fut observé que les mutants *imp2* étaient très sensibles au stress oxydant causé par divers agents tel la bléomycine, le peroxyde d'hydrogène, le tert-butylhydroperoxyde, le paraquat ainsi que la diamide ménadione. Cependant, ils n'étaient pas sensibles aux agents alkylant tels les rayons ultra-violet et le méthyl méthane sulfonate (MMS). Il fut aussi démontré que les mutants

*imp2* éprouvaient de la difficulté à réparer leur ADN en accumulant des cassures simples brins démontrant ainsi qu'Imp2p avait un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de l'ADN chromosomale lors de stress oxydant causé par la bléomycine ou l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Masson et Ramotar, 1996).

En utilisant le système LexA-LacZ, il fut montré qu'Imp2p était un activateur de transcription et que son domaine d'activation était localisé en N-terminale possiblement dans une région fortement acide. Des études de fusion d'Imp2 à la protéine fluorescente verte (Gfp) ont démontré qu'Imp2 se localisait dans le cytoplasme et dans le noyau, possiblement grâce à un signal de localisation nucléaire en N-terminale (Ramotar, non-publié). Ne semblant pas posséder de domaine de liaison à l'ADN, il fut proposé que la région en C-terminale riche en leucine d'Imp2p pourrait être responsable d'interactions avec d'autres facteurs pouvant lier l'ADN, permettant ainsi à Imp2p de jouer son rôle d'activateur de transcription (figure 1.2) (Masson et Ramotar, 1996). De plus, les cystéines de la protéine Imp2 en C-terminale ne semblent pas, contrairement à Yap1p, être impliquées dans la détection du stress oxydant comme l'ont démontré des études de mutagenèse dirigée (Leduc, non-publié). Enfin, un domaine en N-terminale riche en acides aminés sérines (S) et arginines (R) pourrait constituer un site de phosphorylation pouvant modifier l'activité d'Imp2p comme c'est le cas pour d'autres activateurs de transcription tel Met4p (Kaiser et al., 2000)



**Figure 1.2. Représentation schématique de la structure de la protéine Imp2.**

Les nombres indiquent les acides aminés. La barre entièrement noire indique le signal de localisation nucléaire (NLS) compris entre les acides aminés (a.a.) 10 et 15. La bande hachurée entre les a.a. 60 à 109 représente le domaine acide alors que la bande grise (a.a. 272 à 296) indique la région riche en leucines (L) et en cystéines (C). La bande pointillée indique le domaine R/S riche en arginines et en sérines pouvant potentiellement être un lieu de phosphorylation. N et C décrivent la partie N- et C-terminale d'Imp2p (Masson et Ramotar, 1996).

La protéine Imp2 serait aussi impliquée dans le maintien de l'homéostasie ionique car les mutants *imp2* sont sensibles à certains ions monovalents ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Li}^+$ ) et divalents ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$ ). Cette sensibilité se traduit par une accumulation intracellulaire des différents ions comparativement à la levure de type sauvage (Masson et Ramotar, 1998). D'un autre côté, les mutants *imp2* redeviennent résistants au stress ionique lorsqu'on introduit plusieurs copies soit du gène *ENA1* codant pour une pompe ionique de type P ou soit du gène *HAL3* codant pour un inhibiteur de la phosphatase Ppz1 (de Nadal et al., 1998). Les protéines Hal3 et Ppz1 seraient responsables de la modulation de l'expression d'Ena1p. Par contre, les gènes *ENA1* et *HAL3* ne semblent pas être régulés par Imp2p et la plus grande sensibilité au stress ionique du double mutant *ena1/imp2* comparativement aux simples mutants *ena1* et *imp2*, laisserait croire que les deux protéines sont impliquées dans des voies de signalisations différentes (Masson et Ramotar, 1998).

### **1.7 Iip1, une nouvelle protéine interagissant avec Imp2p :**

Même si jusqu'à ce jour l'importance de l'activateur de transcription Imp2 ne fait plus aucun doute lors du stress oxydant, son rôle exact reste encore très obscur. En effet, nous ne savons toujours pas s'il modifie la transcription de certains gènes clés (et lesquels?) ou comment il est activé ou inactivé lors de stress.

Cependant, Uetz et al. (2000) ont publié toutes les interactions protéines-protéines des 6000 ORF (*open reading frame*) chez *Saccharomyces cerevisiae* en utilisant la méthode du deux hybrides. Selon cette étude, Imp2p interagissait avec un seul autre ORF codant pour la protéine hypothétique YLR368w que nous avons renommé Iip1 pour *Imp2 interacting protein 1*. Le rôle cellulaire d'Iip1p est encore inconnu et les mutants de délétion sont viables. Selon sa séquence d'ADN, le gène *IIP1* devrait coder pour une protéine de 598 acides aminés possédant un poids moléculaire d'environ 72 kDa et d'un pI de 6,14. Des études d'analyses d'expression d'ARNm ont identifié le gène *IIP1* comme faisant partie des 500 gènes induit lors de la sporulation (Chu et al., 1998). De plus, une analyse informatique de la séquence d'acides aminés d'Iip1p, n'a identifié qu'un seul motif nommé F-box situé entre les acides aminés 19 et 56. Le motif F-box a été identifié pour la première fois chez les protéines Cdc4 (levure), cycline F (mammifère) et Skp2 (mammifère) (Bai et al., 1996). C'est un motif qui permet des interactions entre protéines habituellement impliquées dans la voie d'ubiquitination. Plus précisément, les protéines possédant le motif doivent emmener les protéines à ubiquitiner au complexe d'ubiquitination.

Finalement, Uetz et al. (2000) affirme qu'Iip1p interagirait avec 7 autres protéines dont 3 ont encore des rôle inconnus (Yjl048, Ypr078 et Ypr093). Les 4 autres sont Csm3p, qui est nécessaire à la ségrégation des chromosomes lors de la méiose, Trr2p, Skp1p et Cdc53p. Le fait qu'Iip1 soit réellement une protéine F-box, est donc appuyé par : 1) la similitude d'un de ses domaines avec le motif F-box et 2) parce qu'elle interagit potentiellement avec deux protéines du complexe d'ubiquitination soit Skp1 et

Cdc53. De plus, en ayant le potentiel d'interagir avec Trr2p et Imp2p, ceci laisse sous-entendre qu'Imp1p pourrait être impliquée dans la réponse au stress oxydant.

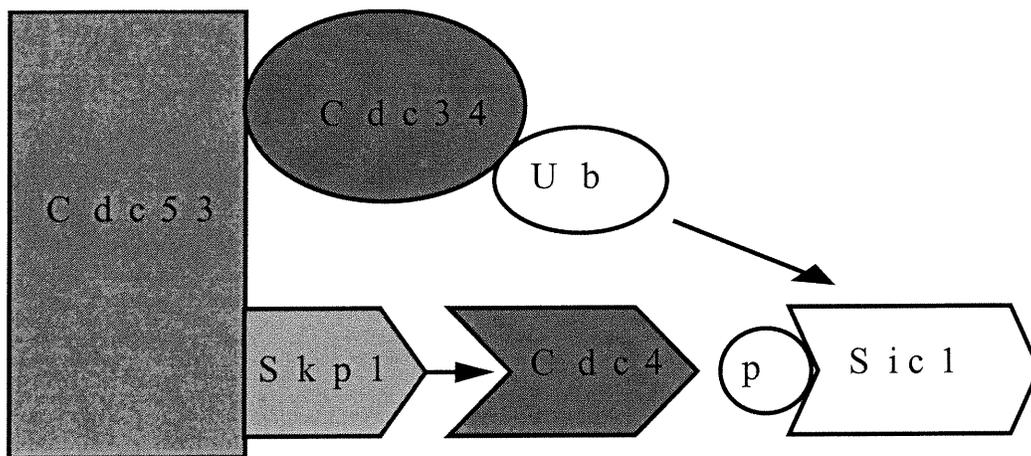
### **1.8 Les protéines F-box et l'ubiquitination :**

L'ubiquitination des protéines joue un rôle essentiel dans plusieurs phénomènes cellulaires. Généralement, une poly-ubiquitination entraînera une dégradation de la protéine par le protéosome 26 S et est surtout observée lors des transitions du cycle cellulaire (phase G<sub>1</sub> à S et de la métaphase à l'anaphase) (Hershko, 1997). Par contre, une simple ubiquitination entraînera une modification de l'activité protéique et est observée dans des phénomènes aussi variés que le transport membranaire et la régulation transcriptionnelle (Hicke, 2001).

Le processus de l'ubiquitination est simple : c'est l'attachement de façon réversible de la partie C-terminale de l'ubiquitine à une lysine de la protéine réceptrice. Pour que la liaison ubiquitine-protéine se fasse, l'ubiquitine est d'abord activée par une enzyme de type E1 (*ubiquitin activating enzyme*) dépendante de l'ATP. Il y aura alors formation d'un lien thiolester entre la protéine E1 et l'ubiquitine et ce lien sera transféré à une seconde enzyme de type E2 (*ubiquitin conjugating enzyme*). Finalement, l'enzyme de type E2, en concert avec le complexe protéique E3 (*ubiquitin ligase complex*), catalysera le lien isopeptidique entre l'ubiquitine et la protéine cible. Dans ce système, se sont les enzymes du complexe E3 qui sont responsable de la spécificité du substrat à ubiquitiner.

Si la protéine doit être poly-ubiquitinée, chacune des autres ubiquitines sera liée par sa partie C-terminale à la lysine 48 de l'ubiquitine précédente (Hochstrasser et al., 1999).

Par exemple, l'inhibiteur de Cdk, Sic1p, doit être dégradé en phase G<sub>1</sub> sinon la réplication de l'ADN ne peut pas avoir lieu (Schwob et al., 1994). Pour y parvenir, la protéine Sic1 est liée à la protéine Cdc4 (une protéine F-box) qui fait partie du complexe SCF ou E3. Ce complexe est composé de trois protéines soit Skp1, Cdc53, Cdc4 (F-box) auquel s'associe la protéine Cdc34 (E2). C'est Cdc34p qui est responsable de l'ubiquitination de Sic1p qui sera ensuite dégradé par le protéosome 26S. Dans le complexe SCF représenté à la figure 1.3, Skp1p lie les protéines ayant un motif F-box comme Cdc4, Cdc34 sert à ubiquitiner les protéines à dégrader alors que Cdc53 est une protéine d'échafaudage maintenant l'intégrité du complexe (Patton et al., 1998). Les protéines Cdc34, Skp1 et Cdc53 sont aussi impliquées dans la dégradation d'une cycline nommée Cln1. Cependant, ce n'est pas la protéine Cdc4 qui lie la cycline Cln1 mais bien la protéine Grr1 qui possède aussi un motif F-box. Donc, la protéine du complexe SCF qui serait responsable de la spécificité du substrat à dégrader serait la protéine F-box (Bai et al., 1996).



**Figure 1.3. Ubiquitination de Sic1p par le complexe SCF.**

Lorsque la protéine Sic1 est phosphorylée, elle peut alors lier la protéine F-box Cdc4. Celle-ci permettra au complexe SCF d'ubiquitiner Sic1p. Dans le complexe, Skip1p a comme rôle de lier la protéine F-box alors que Cdc53p maintient l'intégrité du complexe et que Cdc34p ubiquitine Sic1p.

### **1.9 Problématiques et objectifs :**

La bléomycine est un agent anti-tumoral encore utilisée dans le traitement de plusieurs cancers mais l'apparition de la résistance des cellules tumorales à cet agent limite les traitements. C'est pour cette raison que notre laboratoire s'intéresse au gène *IMP2* qui serait impliqué dans la résistance à la bléomycine (Masson et Ramotar, 1996). Bien que nous sachions qu'Imp2p est impliquée dans plusieurs voies cellulaires, son rôle lors du stress oxydant demeure encore obscure. C'est donc dans l'espoir de mieux caractériser Imp2p que nous avons posé l'hypothèse voulant qu'en situation de stress

oxydant, Iip1p interagit avec Imp2p dans le cadre d'une même voie anti-oxydante afin de modifier l'activité transcriptionnelle de cette dernière.

Notre premier objectif consistait donc à vérifier si l'interaction entre les protéines Imp2 et Iip1 était réelle et non un artéfact dû à la méthode des deux hybrides. Ensuite, nous avons investigué si la protéine Iip1 était impliquée dans le stress oxydant et si elle faisait partie de la même voie anti-oxydante qu'Imp2p. Finalement, nous avons tenté de caractériser le rôle biochimique et cellulaire d'Iip1p en analysant les phénotypes des mutants *iip1*.

## **2. MATÉRIELS ET MÉTHODES :**

### **2.1 Souches et milieux de croissances :**

Les souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* utilisées furent Hansen BY4741 et BY5277 (Research Genetic). La souche KIM01 produisant la protéine Sit4-Ha de façon constitutive fut donnée généreusement par le Dr Kim Arndt, alors que les souches PFY47 et PFY52 sont respectivement isogéniques à BY4741 et BY5277 en plus d'avoir le gène *IMP2* remplacé par la cassette *LEU+* (voir tableau 2.1 pour les génotypes). Les milieux de cultures (Gibco) utilisés pour la croissance de *S. cerevisiae* furent le YPD (1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone et 2% dextrose), le YPEG (1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 3% éthanol et 3% glycérol) et le milieu minimal (0.65% de bases azotées sans acide aminé (Difco), 2% dextrose et 20 µg/ml de chaque acides aminés requis). Au besoin, les milieux furent solidifiés avec 2% Bacto-agar. La souche *E. coli* DH5α fut utilisée pour l'amplification et le maintien des plasmides dans du milieu Luria-Bertani (0,5% Bacto-yeast extract, 1% Bacto-tryptone et 1% NaCl) contenant 50 µg/ml d'ampicilline.

### **2.2 Construction des souches mutantes et des plasmides :**

La délétion du gène *imp2* dans les souches BY4741 et BY5277 fut réalisée par recombinaison homologue en utilisant le protocole de transformation de levure. La cassette utilisée avait comme marqueur *LEU2+* qui était flanqué de régions homologues à *IMP2* ( en 5' de -820 à -620 et en 3' de +850 à +1180) enlevant ainsi tout le promoteur et

91% de la région codante du gène IMP2 des souches BY4741 et BY5277 (Masson et Ramotar, 1996).

Le plasmide pYES-GFP-IIP1 contenant la *green fluorescent protein* (GFP) fut construit comme suit : Le gène IIP1 fut amplifié par PCR à partir d'ADN génomique en utilisant les amorces 368-F2-*Bam*H1 (5'-CAAAGAGGAGGATCCTCTTTATGGTTGGTTCTTCC-3') et 368-R3-*Xba*1 (5'-TTAGAAAATGTCTAGACCGTTAAGGAAAGGCCGCTCG-3') où les bases soulignées désignent respectivement la création d'un site *Bam*H1 et *Xba*1. Le fragment de PCR fut cloné dans le plasmide pYES-GFP-PIR87% (Vongsamphanh et al., 2001) en utilisant *Bam*H1 et *Xba*1 (le fragment PIR87% fut donc éliminé). Le résultat fut le plasmide pYES-GFP-IIP1 contenant les bases +11 à +1900 du gène *IIP1* fusionné en 5' à la *GFP* et inductible par le promoteur *GAL1*. Les plasmides pYES-GFP-IMP2 (Vongsamphanh et al., 2001), pYES-GFP (David, non-publié) et pYES-GFP- $\gamma$ PTPA (David, non-publié) et pYES-HIS-IMP2 (Leduc, non-publié) furent obtenus du laboratoire du Dr Ramotar.

Pour ce qui est de la fusion de la protéine *Iip1* et l'épitope hémagglutinine (Ha), le gène *IIP1* (bases -30 à +1794) fut amplifié par PCR à partir d'ADN génomique en utilisant l'amorce YLR368-F4-*Kpn*1 (5'-CGGTATTAGTTACTAAAAGGTACCCATATACATG-3') possédant un site de restriction *Kpn*1 (caractères soulignés) et l'amorce YLR368-R5-*Xba*1 (5'-CAAGCTTCTAGActaAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATAAATTATGTA

*AAGGCTGTTTCATC*-3') qui possède un site de restriction *Xba*1 (caractères soulignés), un codon d'arrêt (caractères minuscules), la séquence codante pour l'épitope Ha (caractères gras) et la séquence en aval du gène *IIP1* juste avant le codon arrêt (caractères en italiques). Ce fragment de PCR fut cloné dans le vecteur pYES2.0 (Invitrogen) en utilisant les enzymes de restriction *Xba*1 et *Kpn*1 mettant ainsi le gène codant pour la protéine de fusion Iip1-Ha sous le contrôle du promoteur *GAL1*. Tous les plasmides utilisés dans ce mémoire, sont représentés à la figure 2.1

Tableau 2.1. Souches de levures et de bactéries utilisées

Micro-organismes	Souches	Génotypes
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BY4741	mat a <i>his3D1 leu2D0</i> <i>met15D0 ura3D0</i>
	BY5277	mat a <i>his3D1 leu2D0</i> <i>met15D0 ura3D0</i> <i>iip1Δ::KanMX4</i>
	PFY47	mat a <i>his3D1 leu2D0</i> <i>met15D0 ura3D0</i> <i>imp2Δ::LEU2</i>
	PFY52	mat a <i>his3D1 leu2D0</i> <i>met15D0 ura3D0</i> <i>iip1Δ::KanMX4</i> <i>imp2Δ::LEU2</i>
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	<i>SupE 44 ΔlacU169</i> <i>Ø80 lacZ ΔM15</i> <i>hsdR17 recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>

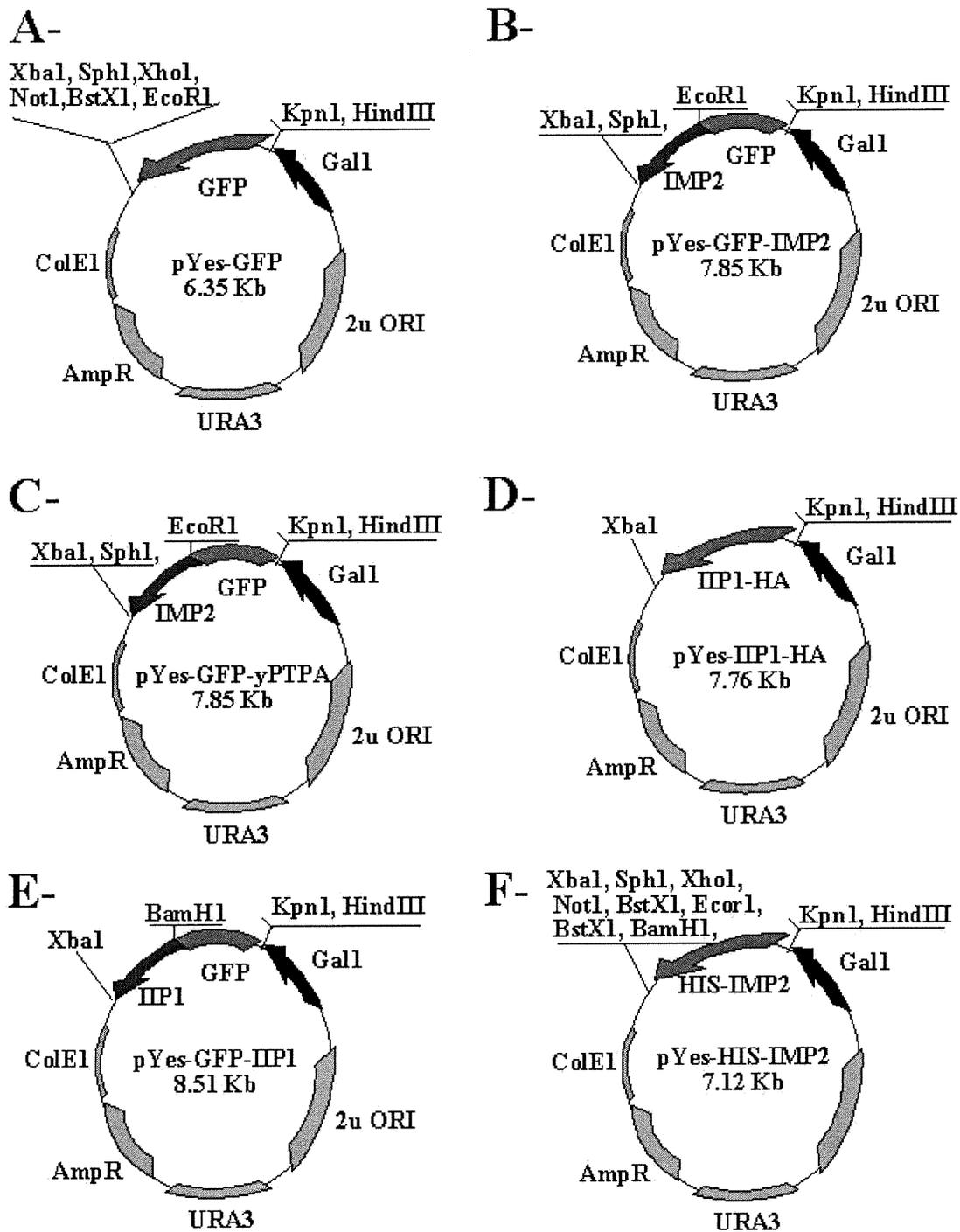


Figure 2.1. Représentation des plasmides utilisés.

A) pYES-GFP, B) pYES-GFP-IMP2, C) pYES-GFP-yPTPA, D) pYES-IIP1-HA,  
 E) pYES-GFP-IIP1 F) pYES-HIS-IMP2.

### **2.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :**

Le protocole utilisé pour les PCR est celui suggéré par New England Biolab avec quelques modifications. En bref, la réaction de PCR était composée de 1 µg de chaque amorces (GibcoBRL), 100 ng d'ADN génomique (provenant de la souche BY4741 et extrait selon le protocole de Ramotar et al. (1991)), 0,2 mM de dNTPs, 10 µl de tampon de PCR 10X (New England Biolab), le tout complété à 100 µl avec de l'eau et 100 µl d'huile minérale. Le programme utilisé est le suivant : Après un *hot start* de 5 minutes à 80°C, 1 µl d'enzyme Vent polymérase (New England Biolab) fut ajouté aux 100 µl de PCR. La température de dénaturation était de 95°C pendant 90 secondes, la température d'appariement de départ était de 56°C et d'une durée de 45 secondes pour descendre de 1°C par cycle pour se stabiliser à 52°C pendant 30 cycles. Finalement, la température de polymérisation était de 72°C pendant 2 minutes avec l'exception de 8 minutes au dernier cycle pour s'assurer de la polymérisation complète des produits de PCR.

### **2.4 Transformation de plasmides et délétion de gènes dans *S. cerevisiae* :**

La méthode utilisée pour la transformation de plasmides et la délétion de gène par recombinaison homologue est décrite par Ito et al. (1983). Les levures sont inoculées dans 1 ml de milieu YPD ou minimal pendant 24 heures à 30°C. Ensuite, les cultures sont diluées 5 fois dans du milieu frais et sont incubées 3 heures à 30°C pour qu'elles soient en phase exponentielle. Les levures sont ensuite centrifugées (3000 rpm pour 1 minute) et lavées une fois avec de l'eau et une fois avec 1 ml de TE/LiAc (10 mM Tris-HCl, 1mM

EDTA, 100mM LiAc, pH 7,5). Les levures furent de nouveau centrifugées pendant 1 minute puis resuspendues dans 150  $\mu$ l de TE/LiAc. 1  $\mu$ g d'ADN plasmidique (ou de cassette de délétion *imp2::LEU2*) et 50  $\mu$ g d'ADN de sperme de saumon soniqué sont ajoutés à 50  $\mu$ l de levures en plus de 300  $\mu$ l de solution TE/LiAc/PEG 40% (TE/LiAc 1X et 40% PEG 3350). Les levures sont alors incubées 2 heures à 30°C pour ensuite subir un choc thermique de 15 minutes à 42°C. Enfin, les levures ont été centrifugées, resuspendues dans de l'eau et étalées sur du milieu sélectif.

### **2.5 Transformation et extraction d'ADN plasmidique dans *E. coli* :**

Les bactéries compétentes et l'extraction d'ADN plasmidique furent préparés en suivant le protocole de Sambrook et al. (1989) alors que la transformation de plasmides fut réalisée comme suit : 200  $\mu$ l de bactéries compétentes sont décongelées de -80°C sur glace pendant 10 minutes pour ensuite y ajouter 50 ng d'ADN plasmidique. Après une incubation sur glace de 30 minutes, un choc thermique de 42°C pendant 90 secondes fut infligé aux bactéries avant de les diluer dans 1 ml de milieu LB et de les incuber une heure à 37°C. Finalement, les bactéries sont centrifugées (12000 rpm, 1 minute), resuspendues dans 50  $\mu$ l de milieu LB et étalées sur un pétrie LB-Agar 2% contenant 50  $\mu$ g/ml d'ampicilline.

## **2.6 Induction et extraction de protéines *S. cerevisiae* :**

L'induction des protéines sous le contrôle du promoteur GAL1 fut faite en ajoutant 0,5% de galactose à 5 ml de levures en milieu minimal sélectif ayant une  $DO_{600nm} = 0,8$ . Après trois heures d'induction, les levures furent lavées une fois avec de l'eau et resuspendues dans 200  $\mu$ l de tampon d'extraction ( 50mM Tris-HCl (pH 8,0), 50mM NaCl, 5% glycérol, 1mM EDTA et 0,5  $\mu$ g/ml de pepstatine, aprotinine et de leupeptine) et 200  $\mu$ l de billes de verre (environ 500  $\mu$ m de diamètre). L'extraction des protéines fut réalisée à l'aide d'un appareil *bead beater* (Bio-Rad) programmé à 5000 rotations par minute (rpm) pendant 20 secondes. Après 5 cycles de *bead beater* avec un temps de repos de 1 minute sur glace entre chaque cycles, les débris cellulaires et les billes de verre furent éliminés par centrifugation (5 minutes, 3000 rpm à 4°C). Les extraits protéiques furent conservés à -80°C après que la concentration des protéines fut déterminée par la méthode de Bradford (1976).

## **2.7 Colonne de phényl-sépharose :**

La préparation de la colonne fut faite comme décrit précédemment (Vongsamphanh et al., 2001) avec quelques modifications mineures. Tout d'abord, 1ml de phényl-sépharose (Pharmacia) fut mis dans un tube eppendorf pour être lavé 3 fois avec du 2 M  $(NH_4)_2SO_4$  afin d'équilibrer la matrice. Le phényl-sépharose fut ensuite transféré dans une colonne de 2 ml (Bio-Rad) à laquelle 1 mg de protéines provenant de levures exprimant la protéine d'intérêt fusionnée à la GFP et préalablement équilibré à

1,7 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fut appliqué. Après 30 minutes d'incubation à 24°C, la colonne fut lavée 3 fois avec 1 ml de tampon d'extraction de protéines pour ensuite ajouter 1 mg d'extrait protéique contenant la protéine fusionnée à l'épitope Ha. Après une incubation de 1 heure à 24°C, la colonne fut rincée avec 5 ml de tampon d'extraction de protéines pour éliminer les interactions non-spécifiques et les billes de phényl-sépharose auxquelles étaient associées les protéines, furent directement analysées par buvardage Western.

### **2.8 Buvardage Western :**

Les gels de polyacrylamide (29 parts d'acrylamide pour 1 part de bis-acrylamide) utilisés avaient une concentration de 12 % et les membranes choisies pour le buvardage étaient faites de nitrocellulose Hybond C (Amersham). À moins d'avis contraire, 50 µg de protéines furent déposés dans chaque puits. Les anticorps primaires anti-Gfp (Clontech), anti-Ha (Santa Cruz), anti-His (Santa Cruz) ou anti-Ubiquitine (Zymed) et l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxidase (Amersham) furent dilués 1 : 2500 dans du tampon (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, et 5 % de lait en poudre). Le protocole standard utilisé pour l'ensemble du buvardage est décrit par Gershoni et Palade (1983). Il faut cependant noter que les anticorps primaires furent incubés 16 heures à 4 °C avec la membrane contrairement à 1 heure à la température de la pièce pour l'anticorps secondaire. La détection fut réalisée par chimiluminescence (Dupont-NEN) comme il est décrit par le manufacturier.

### **2.9 Pétris avec ou sans gradient de concentration:**

Les pétris de gradient furent réalisés sensiblement comme décrits précédemment (Masson et Ramotar, 1998). À 30 ml de YPD-agar liquide à 55 °C, 25 µl de peroxyde d'hydrogène (Sigma) furent ajoutés. Le tout fut coulé dans un pétri de polystyrène de 9 cm<sup>2</sup> ayant une inclinaison d'une dizaine de degrés. Après que l'agar eut figé, celui-ci fut couvert en position non-inclinée de 35 ml de YPD-agar pour remettre l'agar du pétri à niveau. Ensuite, 15 µl de milieu de culture stationnaire de levures furent mélangés à 1ml de YPD-agar 1% (55 °C) et déposés sur le milieu dans le sens du gradient avec l'aide d'un côté de lame à microscope. Les pétris furent incubés à 30 °C pendant 48 heures. Le degré de résistance relative de chacune des souches au peroxyde d'hydrogène fut déterminé en fonction de leur capacité à croître le long du gradient.

Pour ce qui est des pétris sans gradient de concentration, ils furent conçus comme suit : À 20 ml de YPD-agar 2 % ou YPEG-agar 2 % encore liquide fut ajouté soit 5-20 mM de glutathion ou soit 400 mM de sulfate de fer et le tout fut coulé dans des pétris circulaires sans inclinaison. Les pétris furent ensuite séchés 2 heures à 37 °C avant d'étaler les souches de levures à l'aide d'un manche de Koch. La croissance des souches fut analysée après 2 jours d'incubation à 30 °C.

### **2.10 Microscopie :**

Les cultures de levures en phase logarithmique ( $DO_{600nm} = 0,8$ ) furent incubées 20 minutes à 28 °C en présence de 10 µg/ml de 4,6-diamidino-2-phénylindole, aussi appelé DAPI (Sigma), ou de 500 nM de MitoTracker CM-H<sub>2</sub>XROS (Molecular Probe) selon les directives des manufacturiers. Les levures furent ensuite lavées trois fois avec de l'eau avant d'être observées au microscope (400X) sur fond clair pour visionner la fluorescence émise par le DAPI et avec un filtre de type N21-Rhodamine (Leica) pour visionner la fluorescence émise par le MitoTracker CM-H<sub>2</sub>XROS. Pour ce qui est de la localisation cellulaire des protéines Gfp-Iip1 et de Gfp-Imp2, des levures induites 3 heures au galactose furent simplement observées au microscope (400X) avec le filtre I3-FITC (Leica). Les photographies ont toutes été prises par une caméra (CoolSnap) rattachée à un microscope à fluorescence (Leitz).

### **2.11 Décompte des colonies :**

Des cultures de levures en phase stationnaires furent diluées avec du YPD à une  $DO_{600nm} = 0,3$ . En phase logarithmique ( $DO_{600nm} = 0,8$ ), ces cultures furent lavées trois fois et diluées ( $10^{-4}$ ) avec de l'eau stérile etensemencées sur un pétri de YPD agar. Après une incubation de 2 jours à 30 °C, les colonies furent comptées selon leurs grosseurs en les comparant au phénotype sauvage. D'un autre côté, la grosseur des cellules fut évaluée simplement en regardant au microscope optique (400X) les cultures en phase stationnaire et en comparant les mutants au type sauvage. Il est important de souligner que chaque

expérience fut répétée un minimum de trois fois pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

### **2.12 Programme informatique utilisé:**

Les constructions de plasmides se sont faites essentiellement en utilisant le site Internet *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) qui contient les programmes BLAST et FASTA. L'analyse de la séquence protéique d'Iip1 fut faite avec l'aide des programmes *Pattern/Peptide Match* et *PIR Domain Similarity Search* (site Internet : <http://pir.georgetown.edu/pirwww/>) afin de prédire certaines de ses caractéristiques comme par exemple sa localisation cellulaire.

### **3. RÉSULTATS :**

#### **3.1 Iip1p interagit spécifiquement avec Imp2p *in vitro* :**

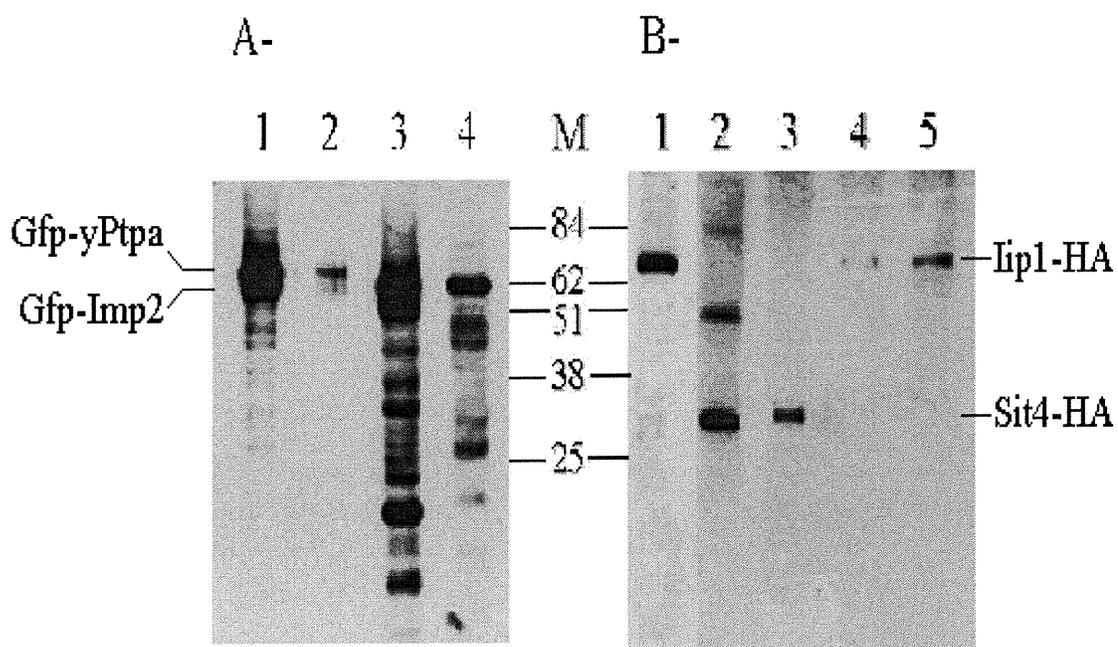
Afin de vérifier si l'interaction entre les protéines Iip1 et Imp2 était réelle et non pas un faux positif (voir discussion), nous avons mis à profit la particularité de la protéine Gfp de lier les colonnes hydrophobes composées de phényl (Vongsamphanh et al., 2001). C'est en fusionnant la Gfp à d'autres protéines tel Imp2 que nous avons créé une colonne d'affinité où Iip1p pouvait potentiellement se lier.

Nous avons donc mis sur la colonne 1 mg d'extraits protéiques contenant Gfp-Imp2 (63 kDa) et Gfp-yPtpa (72 kDa) provenant de la souche BY4741 transformée avec les plasmides pYES-GFP-IMP2 et pYES-GFP-yPTPA (figure 3.1A, colonne 1 et 3). La liaison des deux protéines à la colonne fut vérifiée par buvardage Western en utilisant l'anticorps anti-Gfp (figure 3.1A, colonne 2 et 4). Il est à noter que la multitude de bandes observées à la figure 3.1A proviennent vraisemblablement de la modification (par exemple l'ubiquitination) ou de la dégradation de la protéine surexprimée.

Après s'être assuré que le plasmide pYES-IIP1-HA produisait bien dans la souche BY4741 la protéines Iip1-Ha (73 kDa) et que la souche KIM01 produisait la protéine Sit4-Ha (fig. 3.1B, colonne 1 et 2), nous avons appliqué 1 mg de ces extraits protéiques sur la colonne. Après avoir lavé les billes auxquelles étaient associées les protéines, celles-ci furent analysées directement par buvardage Western. Un anticorps anti-Ha fut

utilisé dans le but de vérifier si les protéines fusionnées à l'épitope HA avaient été retenues par la colonne.

Il fut publié que la protéine yPtpa interagit avec la protéine Sit4 (Mitchell et Sprague, 2001) et comme nous pouvons observer sur la figure 3.1B à la colonne 3, il semble que Gfp-yPtpap est capable de retenir Sit4-Hap sur la colonne de phényl-sépharose constituant ainsi un excellent témoin positif. Pour notre témoin négatif, aucune interaction entre les protéines yPtpa et Iip1 ne fut jamais rapportée et il semble en effet que la protéine Gfp-yPtpa est incapable de retenir la protéine Iip1-Ha sur la colonne d'affinité (fig. 3.1B, colonne 4). Cependant, la protéine Iip1-Ha est retenue dans la colonne de Gfp-Imp2 indiquant une interaction spécifique entre les deux protéines (fig. 3.1B, colonne 5). Nos résultats tendent donc à appuyer ceux obtenus *in vivo* par la technique des deux hybrides (Uetz et al., 2000).



**Figure 3.1. Buvardage Western démontrant l'interaction *in vitro* entre Iip1 et Imp2.**

A) Buvardage Western avec l'anticorps anti-Gfp démontrant l'expression de Gfp-yPtpa (pYES-yPTPA, BY4741) à partir d'extraits protéiques bruts (colonne 1) ou purifiés par la colonne d'affinité (colonne 2). Les colonnes 3 et 4 désignent respectivement les extraits bruts et purifiés de la protéine Gfp-Imp2 (pYES-IMP2, BY4741). B) Buvardage Western avec l'anticorps anti-Ha. Les colonnes 1 et 2 représentent respectivement l'expression d'extraits bruts des protéines Iip1-Ha (pYES-IIP1-HA, BY4741) et Sit4-Ha (KIM01). La colonne 3 représente l'interaction entre les protéines Gfp-yPtpa et Sit4-Ha, car cette dernière est retenue sur la colonne de Gfp-yPtpa alors que la protéine Iip1-Ha ne l'est pas (colonne 4). Cependant, Gfp-Imp2p interagit avec la protéine Iip1-Ha et retient celle-ci sur la colonne de phénylsépharose (colonne 5). Pour A) et B) la colonne M indique un marqueur de poids moléculaire en kiloDaltons (kDa).

### **3.2 Iip1p est impliquée dans le stress oxydant indépendamment d'Imp2p :**

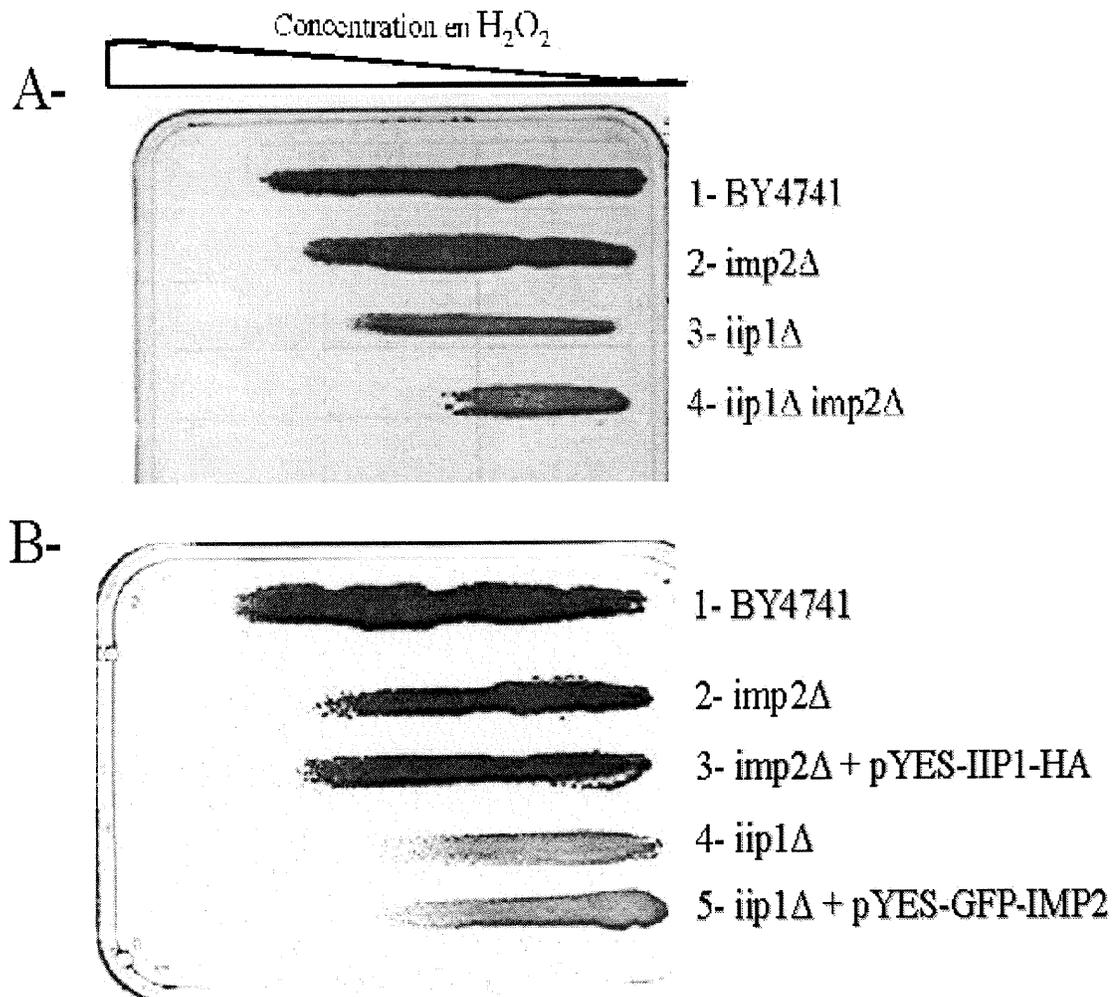
Étant donné que les mutants *imp2* sont sensibles au stress oxydant causé notamment par le peroxyde d'hydrogène, il était possible que les protéines Imp2 et Iip1 interagissent ensemble dans le cadre d'une même voie anti-oxydante. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons créé un double mutant de délétion *iip1 imp2* en éliminant le gène *IMP2* dans la souche BY5277 (PFY52). Ensuite, nous avons comparé la résistance des simples mutants *iip1* (BY5277) et *imp2* (PFY47) et du double mutant *iip1 imp2* au peroxyde d'hydrogène en utilisant la technique du pétri avec gradient. Comme nous pouvons le constater à la figure 3.2A à la ligne 3, le simple mutant *iip1* est plus sensible au peroxyde d'hydrogène que la souche sauvage (ligne 1) constituant ainsi notre première évidence que la protéine Iip1 est nécessaire à la défense contre le stress oxydant.

De plus, le double mutant *iip1 imp2* (fig. 3.2A, ligne 4) est encore plus sensible au peroxyde d'hydrogène comparativement aux deux simples mutants *iip1* et *imp2* (fig. 3.2A, ligne 2 et 3) suggérant ainsi que les deux protéines en question fassent partie de deux voies anti-oxydantes différentes. En effet, si les protéines Iip1 et Imp2 faisaient partie de la même voie anti-oxydante, la résistance au peroxyde d'hydrogène du double mutant *iip1 imp2* aurait été la même que celle d'au moins un des simples mutants de délétion car dans les deux cas, une seule voie anti-oxydante aurait été inactivée.

L'hypothèse voulant qu'Iip1p et Imp2p fassent partie de deux voies anti-oxydantes différentes est aussi appuyée par des études de complémentation, car le fait de

surexprimer la protéine Iip1-Ha dans un mutant *imp2* ou la protéine Gfp-Imp2 dans un mutant *iip1* ne restaure pas la résistance sauvage aux mutants face au peroxyde d'hydrogène (fig. 3.2B, ligne 3 et 5). Si les deux protéines étaient impliquées dans la même voie anti-oxydante, le fait de surexprimer une protéine ayant une fonction en aval de la voie aurait pu permettre d'obtenir une résistance sauvage au stress oxydant même si une protéine située en amont de la voie avait été déléetée. Il est très important de prendre note que la fonctionnalité de nos fusions fut démontré à la section 3.5 et dans un article antérieur pour le plasmide pYES-GFP-IMP2 (Vongsamphanh et al., 2001).

Nous sommes donc en présence de deux protéines, soit Iip1 et Imp2, qui interagissent entre elles, dont leur mutant de déléetion est sensible au stress oxydant mais qui font partie de deux voies de signalisation différentes. L'étape suivante la plus logique était donc de caractériser la protéine Iip1 dans l'espoir d'en savoir un peu plus sur la nature de son interaction avec Imp2p.



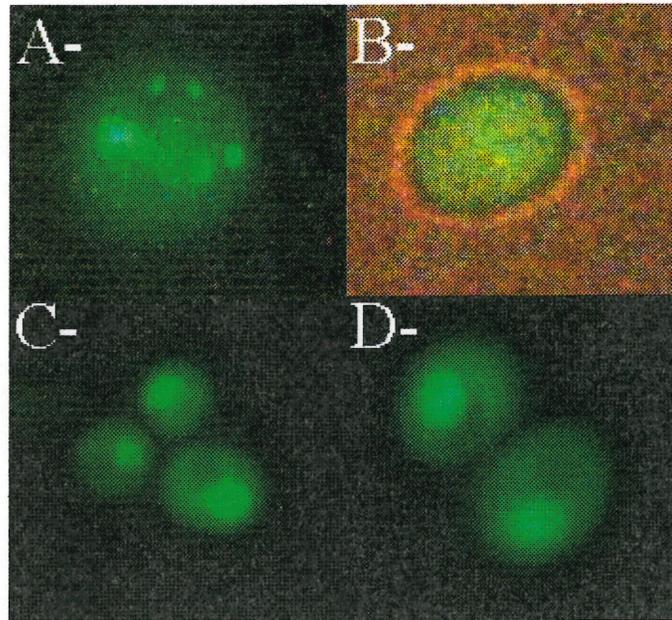
**Figure 3.2. Sensibilité du mutant *iip1* et *imp2* à un gradient d' $H_2O_2$ .**

Les pétries A- et B- contiennent un gradient de peroxyde d'hydrogène augmentant de droite à gauche. En A-, les souches utilisées sont BY4741 (ligne 1), les simples mutants *imp2* (PFY47, ligne 2) et *iip1* (BY5277, ligne 3) et le double mutant *imp2 iip1* (PFY52, ligne 4). En B-, la ligne 1 représente la souche sauvage BY4741 alors que la ligne 2 représente le mutant *imp2* (PFY47) qui fut aussi transformé avec le plasmide pYES-IIP1-HA (ligne 3). Le mutant *iip1* (PFY52) est représenté à la ligne 4 et fut transformé avec le plasmide pYES-GFP-IMP2 (ligne 5).

### **3.3 Localisation cellulaire d'Iip1p :**

Nous avons fusionné la protéine Gfp à Iip1 afin de localiser la protéine Iip1. Les mutants *iip1* transformés avec le plasmide pYES-GFP-IIP1 ne formaient pas de *petites* (voir section 3.5 des résultats) démontrant ainsi que la fusion de Gfp n'altérait pas la fonction d'Iip1. La localisation d'Iip1 est montrée à la figure 3.3B, où l'on voit que la protéine est située uniformément dans le cytoplasme dans la souche BY4741 contrairement à la protéine Gfp seule (pYES-GFP) qui tend plutôt à former des agrégats dans le cytoplasme (fig. 3.3A). Ces résultats sont en accord avec le programme informatique *Domain Similarity Search* qui prévoyait une localisation cytoplasmique d'Iip1.

Le fait qu'Iip1p interagisse *in vivo* avec plusieurs protéines, nous fit entrevoir la possibilité qu'Iip1p puisse être impliquée dans la localisation des protéines. Pour tester cette possibilité, nous avons observé la localisation nucléaire d'Imp2 en présence ou en absence d'Iip1. On voit bien à la figures 3.3 que la localisation majoritairement nucléaire de la protéine Gfp-imp2 (pYES-GFP-IMP2) est identique chez le mutant *iip1* (fig. 3.3D) que chez la levure de type sauvage (fig. 3.3C). Il semblerait donc que la protéine cytoplasmique Iip1 ne soit pas essentielle à la localisation nucléaire d'Imp2.

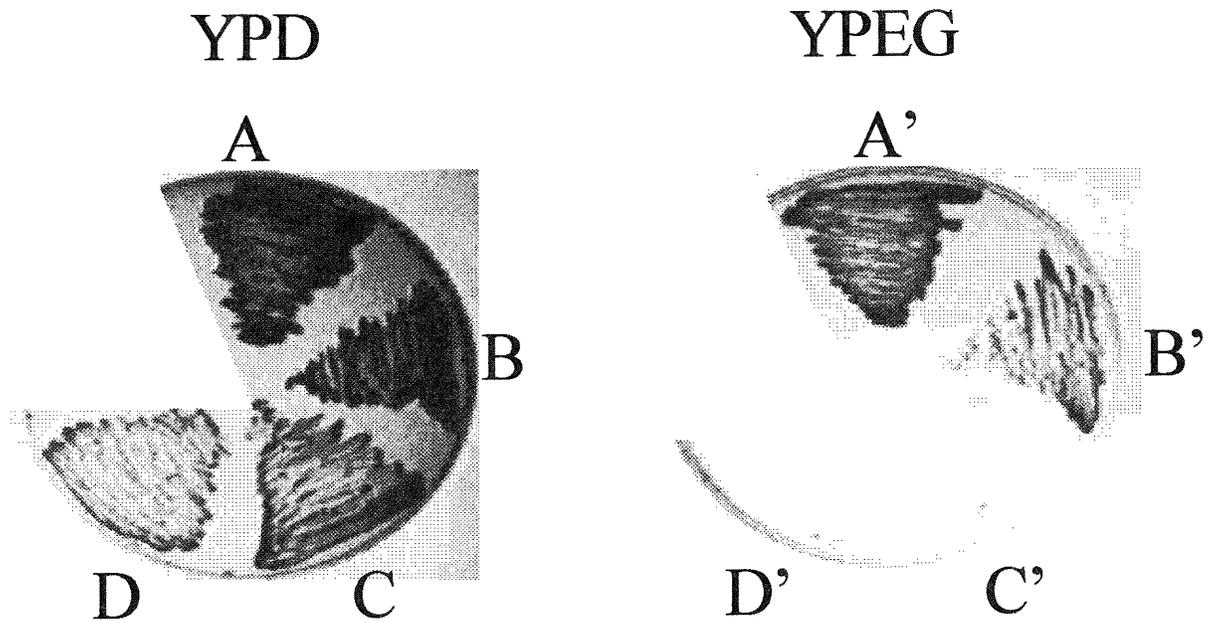


**Figure 3.3. Localisation cytoplasmique de la protéine lip1 fusionnée à la Gfp.**

Les images A à D représentent respectivement BY4741 (pYES-GFP), BY4741 (pYES-GFP-IIP1), BY4741(pYES-GFP-IMP2) et BY5277 (pYES-GFP-IMP2). Les photographies ont toutes une amplification de 400X et ont été prises par microscopie à fluorescence. En B, la lumière fut réglée à 50 % fluorescence et 50 % lumière sur fond clair pour souligner la localisation strictement cytoplasmique de Gfp-Iip1p.

### **3.4 Iip1p est nécessaire à la croissance sur un milieu respiratoire :**

Il a été abondamment décrit dans la littérature que les levures ayant une déficience mitochondriale étaient plus sensibles au stress oxydant que les levures de types sauvages (Jamieson, 1992). Une façon rapide et efficace de vérifier l'intégrité des mitochondries chez la levure est de tester sa croissance sur un milieu de type respiratoire. Une souche de levure poussant normalement sur un milieu fermentaire composé de dextrose (YPD) mais ne pouvant croître sur un milieu respiratoire composé d'éthanol ou de glycérol comme sources de carbone, sera considérée comme ayant des mitochondries partiellement ou totalement non-fonctionnelles. Comme on le voit sur la figure 3.4C, la souche mutante *iip1* n'a aucune difficulté à croître sur un milieu fermentaire contrairement au milieu respiratoire sur lequel elle ne peut croître, démontrant ainsi une déficience mitochondriale. Il est aussi très intéressant de noter qu'un mutant de délétion pour le gène *imp2* est capable de croître sur un milieu respiratoire (fig. 3.4B) laissant sous-entendre que les protéines Iip1 et Imp2 sont impliquées dans des voies de signalisations différentes. Cette interprétation est aussi supportée par le fait que la surexpression de la protéine Gfp-Imp2 dans un mutant *iip1* ne restaure pas la croissance sur un milieu respiratoire (fig. 3.4D).



**Figure 3.4. Les mutants *iip1* sont incapables de croître sur un milieu respiratoire.**

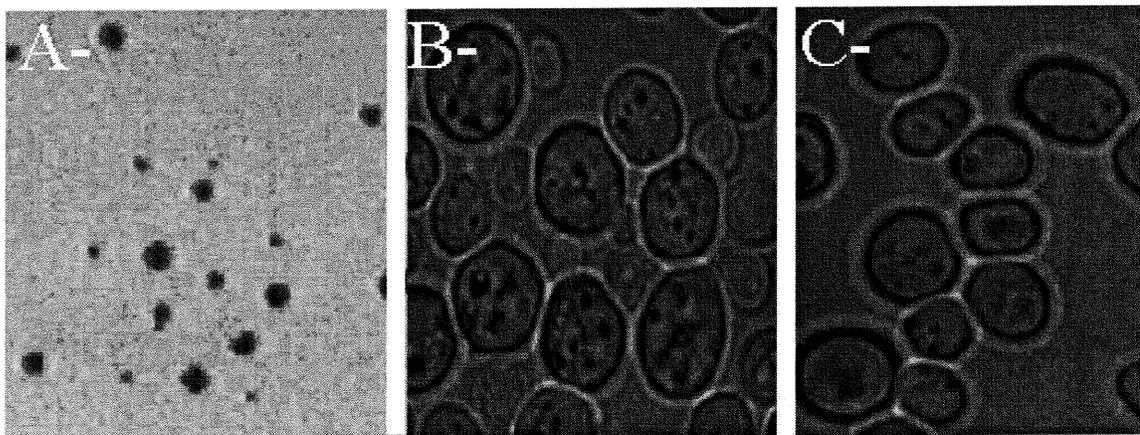
Les souches BY4741 (A), PFY47 (mutant *imp2*) (B), BY5277 (mutant *iip1*) (C) et BY5277 + pYES-GFP-IMP2 (D) ont été étalées sur un milieu fermentaire (YPD) et un milieu respiratoire (YPEG) pendant deux jours à 30°C.

### **3.5 L'absence d'IIP1 cause la formation de *petite* :**

Il fut mainte fois démontré qu'une levure ayant une déficience au niveau de ses mitochondries tel les mutants *gsh1*, allait croître plus lentement sur un milieu fermentaire comparativement à la souche sauvage d'où le phénotype de *petite* (Lisowsky, 1993). Ce phénotype est apparent chez les mutants *iip1* $\Delta$  qui forment spontanément des petites colonies lorsqu'on ensemence un pétri de YPD agar à partir d'une culture en phase logarithmique (figure 3.5A). On peut aussi observer que les levures mutantes *iip1* sont de plus petites tailles (figure 3.5C) que celles du type sauvage (figure 3.5B) laissant sous-entendre qu'elles seraient des *petites cytoplasmiques*.

Cependant, les résultats les plus surprenants se retrouvent aux tableaux 3.1 et ils introduisent le concept du dommage permanent. En effet, les mutants de délétion pour le gène *iip1* vont, à partir d'une grosse colonie, générer 46 % de petites colonies et ce, de façon irréversible. De plus, tout réensemencement de levures *iip1* à partir de petites colonies ne formera que de petites colonies et ce, même si on introduit le plasmide pYES-IIP1-HA. Par contre, si on insère le plasmide pYES-IIP1-HA ou pYES-GFP-IIP1 dans une levure *iip1* avant qu'elle présente le phénotype *petite*, le pourcentage de formation de petites colonies redevient comparable à celui du type sauvage soit 8 %. Ceci prouve que les plasmides pYES-IIP1-HA et pYES-GFP-IIP1 produisent des protéines fonctionnelles pouvant prévenir les dommages permanents chez les mutants *iip1*. Il est aussi important de remarquer que le plasmide pYES-GFP-IMP2 ne peut en aucun cas réduire le pourcentage de formation de petites colonies chez les mutants *iip1*. Il apparaît donc qu'en

l'absence de la protéine Iip1, la levure peut subir des dommages dit permanents que même la réinsertion d'*iip1p* ne pourra réparer. Cette affirmation soulève plusieurs questions intéressantes dont la nature de ces dommages. C'est pour répondre à cette dernière question que nous avons analysé plus en profondeur l'état des mitochondries chez les mutants *iip1*. Il est aussi important de noter que pour les expériences ultérieures nous avons utilisé les mutants *iip1* présentant le phénotype de *petite*.



**Figure 3.5. Les mutants *iip1* ont le phénotype de *petite*.**

En A, les mutants *iip1* forment spontanément des petites colonies lorsqu'ils sont ensemencés deux jours sur du YPD à 30°C. Les figures B et C sont une comparaison entre la taille des levures BY4741 (en B) et les levures BY5277 (en C). En B et C, les photographies ont été prises par microscopie optique sans filtre avec un agrandissement de 400X alors qu'en A aucun agrandissement n'a été nécessaire.

Tableau 3.1. Analyse comparative de la formation de petites colonies entre le type sauvage et le mutant *iip1*.

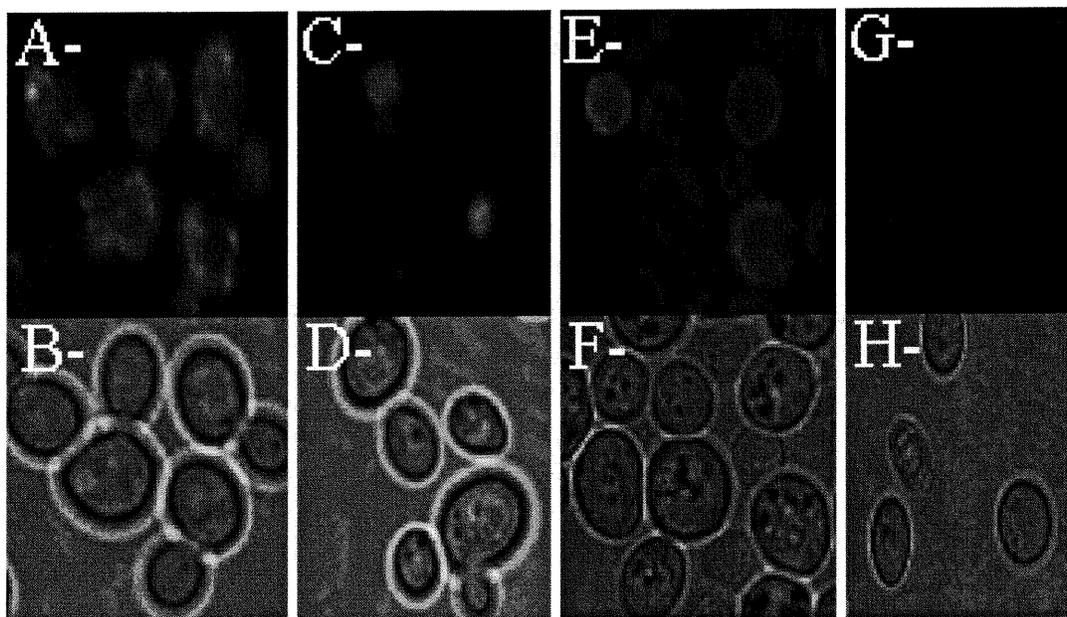
Grosseur des colonies	BY4741  (%)	BY5277  (%)	BY5277 + pYES-IIP1- HA (%)	BY5277 + pYES-GFP- IIP1 (%)	BY5277 + pYES-GFP- IMP2 (%)
petites	3 ± 2	46 ± 8	8 ± 10	12 ± 5	47 ± 3
grosses	97 ± 2	54 ± 8	92 ± 10	88 ± 5	53 ± 3

### **3.6 Les mutants *iip1* ont des déficiences mitochondriales sévères :**

Étant donné que les mutants *iip1* démontrent plusieurs phénotypes reliés à une déficience des mitochondries, nous avons tenté de caractériser le type de dommage engendré à ces organelles en l'absence d'Iip1p. Nous avons donc regardé dans un premier temps si les mitochondries des mutants *iip1* étaient aptes à remplir leur rôle principal, soit de produire de l'ATP. Pour y parvenir, nous avons utilisé un colorant nommé Mitotracker qui s'accumule dans les mitochondries (excitation et émission fluorescente à 579 nm et 599 nm respectivement) seulement si elles possèdent un potentiel de membrane. Une fois séquestré dans les mitochondries, le colorant Mitotracker sera oxydé et émettra une fluorescence. Chez la levure de type sauvage, on aperçoit bien la fluorescence du colorant Mitotracker comparativement aux levures *iip1* où on ne peut l'apercevoir, suggérant que la totalité des mitochondries ne sont pas fonctionnelles (figure 3.6E et 3.6C). Un phénotype aussi drastique nous laisse croire qu'une absence d'Iip1p pourrait mener à une instabilité de la chaîne respiratoire et/ou de l'ADN mitochondriale qui dans les deux cas empêche la création d'un gradient électrochimique.

Nous avons donc regardé dans un deuxième temps, l'état de l'ADN mitochondriale car plusieurs souches de levures présentant des phénotypes de *petites* ont des délétions partielles ( $\rho^-$ ) ou totales ( $\rho^0$ ) de leurs ADN mitochondriale (Contamine et Picard, 2000). Il serait possible que l'absence d'Iip1p entraîne une instabilité au niveau de l'ADN mitochondriale expliquant ainsi les dommages permanents observés chez les mutants *iip1*. Comme on peut voir sur la figure 3.6A qui représente des levures de types sauvages

colorées au DAPI, leur ADN mitochondriale semble abondant et localisé en périphérie de la cellule. Cependant, le mutant *iip1* ne semble posséder que de l'ADN génomique (cercle fluorescent situé au centre de la levure) mais aucun ADN mitochondriale laissant croire à d'importantes délétions de celui-ci (fig. 3.6C).



**Figure 3.6. Les mutants *iip1* ne possèdent pas de mitochondries fonctionnelles.**

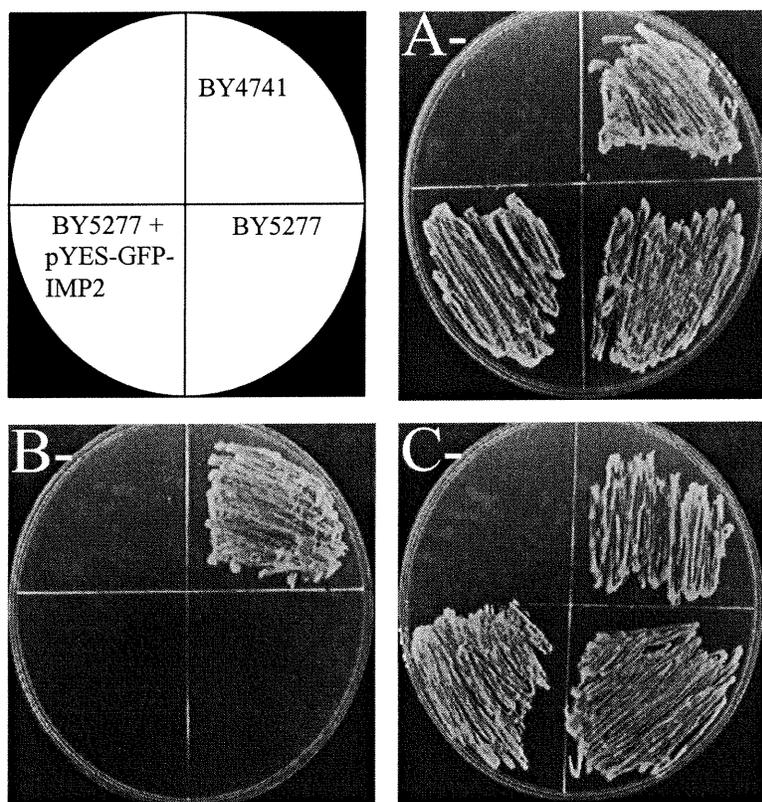
Les photographies A- et C- représentent respectivement les souches BY4741 et BY5277 colorées avec le marqueur fluorescent DAPI alors que E- et G- représente respectivement les mêmes souches colorées avec le marqueur Mitotracker. Les figures B- et D- représentent la même image que A- et C-, à la différence que la photographie a été prise en laissant passer un rayon lumineux. Il en est de même pour les figures F- et H- qui représente les images E- et G-. Toutes les photographies ont été prises avec un agrandissement de 400X.

### **3.7 L'état redox et le métabolisme du fer ne semblent pas affectés chez les mutants *iip1* :**

Étant donné que les protéines Iip1 et Imp2 ne semblaient pas faire partie de la même voie de signalisation et que les mutants *iip1* formaient spontanément des *petites*, nous avons vérifié si Iip1p n'était pas impliquée dans d'autres voies cellulaires dont l'altération entraînait la formation de *petite*. Chez les levures dont l'état redox est altéré, la perte de mitochondries est fréquente du à l'oxydation de celles-ci. C'est le cas des mutants *gsh1* dont le phénotype de *petite* peut être prévenu si les levures sont en présence d'une source exogène de glutathion (Grant et al., 1996). Dans le but de tester si Iip1p avait un rôle à jouer dans le maintien de l'état redox des cellules, nous avons fait croître les mutants *Iip1* en présence de glutathion (5, 10, 15 et 20 mM) sur du milieu YPEG. Les levures de types sauvages n'ont aucune difficulté à croître sur un milieu de YPEG + glutathion alors que les mutants *Iip1* en sont incapables. Les résultats étant identiques peu importe la concentration de glutathion, la figure 3.7B ne montre que la concentration de 10 mM. Ceci suggère donc que contrairement à la protéine Gsh1, Iip1p ne semble pas impliquée dans le maintien de l'état redox de la levure et que la perte des mitochondries chez les mutants *Iip1* n'est pas due à une augmentation du stress oxydant endogène.

La formation de *petites* colonies peut aussi être due une anomalie du métabolisme du fer comme c'est le cas pour les mutants *yfh*. Nous avons donc fait croître les mutants *Iip1* sur du milieu YPD contenant 400 mM de sulfate de fer qui est une concentration toxique pour les mutants *yfh* (Foury et Cazzalini, 1997). La figure 3.7C démontre que les

mutants *lip1* ne semblent pas être sensibles au fer indiquant que la perte d'*Iip1p* ne semble pas interférer avec l'homéostasie mitochondriale du fer.



**Figure 3.7. *Iip1p* ne semble pas impliquée dans le maintien de l'état redox et le métabolisme du fer de la levure.**

La souche sauvage croît sans difficulté sur un milieu YPD (A-), YPEG contenant 10 mM de glutathion (B-) ou un milieu YPD contenant 400 mM de sulfate de fer (C-). Cependant, la souche BY5277 ne peut toujours pas croître sur du YPEG contenant du glutathion, mais un milieu YPD contenant du sulfate de fer n'empêche pas sa croissance. Il est intéressant de noter que les phénotypes obtenus de BY5277 sont identiques aux phénotypes de BY5277 exprimant la protéine Gfp-Imp2 à partir du plasmide pYES-GFP-IMP2.

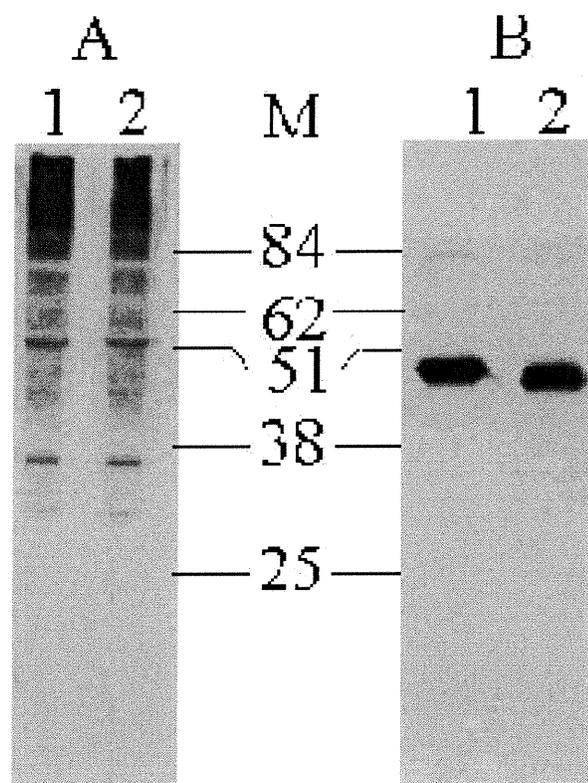
### **3.8 L'absence d'Iip1p ne semble pas altérer l'ubiquitination des protéines :**

La protéine Iip1 possède une séquence d'acides aminés semblable au motif F-box et elle interagit *in vivo* avec des protéines du complexe SCF. Nous avons donc investigué l'hypothèse qu'Iip1 serait une protéine F-box impliquée dans le processus de l'ubiquitination. Pour y parvenir, nous avons analysé si l'absence d'Iip1p entraînait des différences au niveau de l'ubiquitination des protéines avec lesquelles elle interagit. En effet, si la protéine Iip1 était réellement une protéine F-box, on peut s'attendre à ce que son absence empêche le complexe SCF d'ubiquitiner certaines protéines. Nous avons regardé par buvardage Western s'il y avait une différence entre l'ubiquitination des protéines provenant d'une levure de type sauvage et un mutant *iip1*. En utilisant la même méthode, nous avons aussi vérifié si Imp2p était modifiée différemment en l'absence d'Iip1p.

Les figures 3.8A et B représentent respectivement des buvardages Western réalisés avec des anticorps anti-Ubiquitine et anti-His. Les colonnes 1 et 2 représentent respectivement des extraits protéiques provenant des souches BY4741 et BY5277. Les levures utilisées pour la figure A ont poussé en phase exponentielle dans du YPD, alors que pour la figure B, elles ont poussé dans du milieu minimal avant d'être induites trois heures avec du galactose. Il est à noter que seulement les souches utilisées pour la figure B possédaient un plasmide (pYES-HIS-IMP2) exprimant la protéine His-Imp2.

En comparant la colonne 1 et 2 de la figure 3.8A, aucune différence ne peut être observée entre l'ubiquitination des protéines chez la souche sauvage et le mutant *iip1*, car les bandes représentant des protéines ubiquitinées sont identiques dans les deux cas. Ce résultat suggère que l'absence d'*Iip1* n'altère pas de façon globale le processus d'ubiquitination chez *S. cerevisiae*. De plus, il est difficile d'affirmer si des protéines précises ne sont pas ubiquitinées chez les mutants *iip1*, car aucune protéine n'a été surexprimée.

La figure 3.8B démontre que la protéine His-Imp2 semble être modifiée différemment chez le mutant *iip1* comparativement à la souche sauvage. En effet, la souche mutante *iip1* semble synthétiser une protéine His-Imp2 d'environ 3 kDa inférieure à celle produite par la souche sauvage. Cependant, cette différence ne pourrait pas provenir d'une défectuosité de l'ubiquitination, car une seule molécule d'ubiquitine augmente le poids moléculaire d'une protéine de 8 kDa.



**Figure 3.8. Iip1p ne semble pas impliquée dans l'ubiquitination d'Imp2p et dans l'ubiquitination générale des protéines.**

Les figures A et B représentent respectivement des buvardages Western réalisés avec les anticorps anti-ubiquitine et anti-His. Les extraits protéiques utilisés provenaient des souches BY4741 (colonnes 1A et 1B) et BY5277 (colonnes 2A et 2B). Les souches utilisées pour la figure B furent préalablement transformées avec le plasmide pYES-HIS-IMP2. La colonne M indique les marqueurs de poids moléculaire et ceux-ci sont en kiloDaltons.

#### **4- DISCUSSION :**

Dans cette étude, une protéine nommée Iip1 qui interagit *in vivo et in vitro* avec la protéine Imp2, fut clonée et caractérisée. Le mutant *iip1* est sensible au stress oxydant tout comme le mutant *imp2*, mais nous n'avons aucune évidence que les deux protéines font partie d'une même voie métabolique. Il semble qu'Iip1 soit essentielle au maintien de l'intégrité des mitochondries, car son absence entraîne la formation de mutants *petites*. Enfin, même si Iip1 a certaines caractéristiques des protéines F-box, nous n'avons pas réussi à démontrer qu'elle était impliquée dans l'ubiquitination des protéines

##### **4.1 Les protéines Imp2 et Iip1 interagissent entre elles :**

Il était important de démontrer qu'Imp2p et qu'Iip1p interagissaient ensemble *in vitro*, car il fut rapporté que la méthode des deux hybrides utilisée par Peter Uetz et al. (2000), génère des interactions sans pertinence physiologique nommées faux positifs. Ceci s'explique par le caractère artificiel des deux hybrides qui cause une sélection énorme en faveur d'une interaction entre les deux protéines testées. S'il n'y a pas d'interaction entre les deux protéines, la levure ne peut croître sur le milieu sélectif. Nous retrouvons donc souvent dans la méthode des deux hybrides des interactions protéiques que nous ne retrouvons pas dans un contexte biologique. Par exemple, il se pourrait que deux protéines qui ne sont jamais en contact (ex.: une des protéines est située dans le noyau et l'autre dans le peroxyosome) soient déclarées interaction positive par la méthode des deux hybrides, car elles interagissent faiblement entre elles.

L'interaction entre Iip1p et Imp2p ne semble pas être un faux positif car les deux protéines semblent aussi interagir *in vitro*. En utilisant une colonne d'affinité et des extraits protéiques, nous avons éliminé la force de sélection présente lors de la méthode des deux hybrides. De plus, la présence de témoins positif et négatif adéquats confirme que les deux protéines aient de l'affinité l'une pour l'autre.

Cependant, la méthode de la colonne d'affinité ne prouve pas que dans un contexte biologique les deux protéines puissent être en contact. Des études de fusion à la Gfp tendent même à démontrer qu'Imp2p serait situé majoritairement dans le noyau alors qu'Iip1p serait cytoplasmique (figure 3.3). Par contre, il fut montré qu'en certaines occasions comme lors de chocs thermiques, la protéine Imp2 quittait le noyau pour former des agglomérats dans le cytoplasme (Ramotar, non-publié). C'est peut-être lors de situations similaires que les deux protéines interagiraient entre-elles. Une seconde hypothèse valable expliquant le moment de l'interaction entre les deux protéines serait lors de la synthèse d'Imp2 dans le cytoplasme où se situe Iip1, réparti de façon uniforme.

#### **4.2 La protéine Iip1 est essentielle lors de stress oxydant :**

Sachant que les protéines Imp2 et Iip1 interagissaient entre elles, l'étape suivante consistait à savoir pourquoi. La méthode que nous avons privilégiée pour y parvenir était de vérifier si les mutants de délétions pour *iip1* et *Imp2* possédaient des phénotypes similaires.

Le premier phénotype commun aux mutants *imp2* et *iip1*, est leur sensibilités au stress oxydant causé par le peroxyde d'hydrogène. Cependant, le fait que le double mutant *imp2 iip1* soit plus sensible au stress oxydant que les simples mutants *imp2* et *iip1* suggère que les deux protéines sont impliquées dans des voies de défenses différentes lors de stress oxydants.

D'un autre côté, il est extrêmement important de comprendre que les résultats obtenus ne prouvent pas hors de tout doute que les deux protéines ne partagent pas une même voie lors d'un stress oxydant. En effet, on pourrait très bien imaginer qu'Imp2p et qu'Iip1p soient impliquées dans plusieurs voies anti-oxydantes en ayant seulement une de commune. Cette hypothèse pourrait expliquer la plus grande sensibilité du double mutant de délétion comparativement aux simples mutants de délétions. Les résultats négatifs des études de complémentations pourraient être dus aux rôles très différents d'Imp2 (activateur de transcription) et d'Iip1 (possiblement une protéine F-box) dont leur surexpression ne peut compléter la voie inactivée. Par exemple, il se pourrait qu'Iip1p soit absolument essentiel à l'activation d'Imp2p qui à son tour est essentiel à la transcription de certains gènes ayant un effet anti-oxydant. On voit mal dans un tel contexte comment la surexpression d'une des protéines puisse compléter l'absence de l'autre protéine.

Les tests de complémentation ayant échoué, nous croyons que c'est en caractérisant davantage les rôles biologiques d'Imp2p et d'Iip1p que nous allons pouvoir vérifier si ces deux protéines font partie d'une même voie anti-oxydante.

### **4.3 Les mutants *iip1* possèdent des mitochondries non-fonctionnelles :**

Un autre phénotype important du mutant *iip1* est son incapacité de croître sur un milieu respiratoire. Il fut abondamment décrit dans la littérature qu'une souche de levure qui est capable de croître sur un milieu fermentaire, mais non sur un milieu respiratoire, possède souvent des mitochondries anormales (Guthrie et Fink, 1991). Ceci est le cas pour les mutants *iip1* dont l'ADN mitochondriale est indétectable par le colorant DAPI et dont le marqueur Mitotracker ne détecte aucun gradient de protons dans les mitochondries. Il n'est donc pas surprenant de voir les mutants *iip1* former spontanément des petites colonies.

Il est difficile de classifier les mutants *iip1* dans la catégorie  $rho^-$  ou  $rho^0$ . Il existe un phénotype chez les mutants *iip1* qui pourrait laisser sous-entendre qu'ils soient  $rho^0$ . En effet, lorsque les mutants *iip1* forment des *petites*, il est impossible qu'ils redeviennent  $rho^+$ , même après la réinsertion du gène *IIP1*. On ne retrouve pas ce phénotype chez les  $rho^-$  qui peuvent reconstituer des mitochondries fonctionnelles lorsqu'on réinsère le gène ayant causé la formation de *petites*. Ceci est possible grâce à la complémentation des fragments d'ADN encore fonctionnels qui ont la capacité de coder pour l'ensemble des protéines nécessaire au bon fonctionnement des mitochondries. Ce n'est pas le cas pour les  $rho^0$  qui ne possèdent plus aucun ADN mitochondriale, rendant ainsi la complémentation impossible. L'expérience qui nous permettrait de déterminer si les mutants *iip1* $\Delta$  forment des *petites*  $rho^0$  serait de faire des buvardages Southern avec plusieurs sondes ciblant divers segments d'ADN mitochondriale comme le suggère la

littérature afin d'être certain que les mutants *iip1* sont vraiment dépourvus d'ADN mitochondriale (Ibeas et Jimenez, 1997).

Par ailleurs, la taille des mutants *iip1* étant plus petite que celle du type sauvage laisserait croire qu'ils seraient des *petites cytoplasmiques* possédant, tout au plus, des fragments de mitochondries. Ce phénotype pourrait expliquer la sensibilité des mutants *iip1* au stress oxydant. En effet, il fut démontré que les levures de type *rho<sup>-</sup>* étaient sensibles au peroxyde d'hydrogène. La raison demeure encore obscure, mais certains auteurs croient que se serait due au manque d'énergie occasionné par la perte des mitochondries et qui serait nécessaire aux facteurs anti-oxydants (He et al., 1996).

Même si nous ne savons toujours pas pourquoi l'absence d'Iip1p entraîne la perte des mitochondries, il est désormais clair que ce n'est pas à cause d'une augmentation du stress oxydant endogène. En effet, il a été rapporté que la délétion de certains gènes tel *GSH1* qui sont impliqués directement dans des voies anti-oxydantes, entraînait la formation de *petites* possiblement à cause d'une augmentation du stress oxydant endogène (Lisowsky, 1993). Cependant, la perte des mitochondries chez ces mutants pouvait être évitée par l'ajout d'agent réducteur tel le glutathion, le dithiothréitol ou le  $\beta$ -mercaptoéthanol (Grant et al., 1996). Ce n'est pas le cas des mutants *iip1* qui ne peuvent toujours pas croître sur du YPEG même en présence de glutathion (figure 3.7B). De plus, les mutants *iip1* ne sont pas sensibles au fer contrairement aux mutants *ycf1* qui forment eux aussi des *petites* (figure 3.7C). Ce phénotype indiquerait que la formation de *petites* en l'absence d'Iip1p ne serait pas due à une accumulation de fer dans les mitochondries.

Bien entendu, la raison exacte de la formation de *petites* chez les mutants *iip1* reste encore inconnue. Non seulement une augmentation en stress oxydant ou une altération du métabolisme du fer provoque ce phénotype, mais il fut rapporté que la délétion de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, dans la synthèse d'ATP, dans le métabolisme des acides gras et dans la morphologies des mitochondries pouvaient aussi entraîner la formation de *petites* (pour résumé voir Contamine et Picard, 2000). Il reste donc plusieurs possibilités à vérifier avant de comprendre pourquoi l'absence d'*Iip1p* entraîne une perte des mitochondries. La première possibilité que nous avons investiguée est celle de l'ubiquitination, car il fut démontré qu'elle est impliquée dans le maintien de la stabilité mitochondriale. Par exemple, la protéine-ubiquitine ligase Rsp5 est essentielle à la stabilité des mitochondries et ce, possiblement en ayant un rôle dans le transport des protéines mitochondriales (Fisk et Yaffe, 1999 et Zoladek et al., 1997).

#### **4.4 Est-ce qu'*Iip1* est une protéine F-box ?**

Le fait qu'*Iip1p* possède une séquence similaire à un motif F-box et qu'elle interagit *in vivo* avec certaines protéines du complexe SCF, nous fit entrevoir la possibilité que cette protéine serait impliquée dans le processus d'ubiquitination en tant que protéine F-box. Le rôle d'*Iip1p* pourrait être d'emmener *Imp2p* au complexe SCF afin que celle-ci se fasse poly-ubiquitiner et ensuite dégrader par le protéosome 26 S (voir introduction pour exemple de *Sic1p*). D'un autre côté, *Iip1p* pourrait en ubiquitinant *Imp2p*, être responsable de la modulation de son activité de facteur de transcription, car il

existe quelques exemples de protéines F-box qui lient des facteurs de transcription afin de les ubiquitiner. C'est le cas de l'activateur de transcription Met4 qui est responsable de la régulation de plusieurs gènes tel *MET25* impliqués dans le métabolisme d'acides aminés sulfurés (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997). Il fut démontré que le complexe SCF comprenant la protéine F-box Met30 était responsable de l'ubiquitination de Met4p. L'ubiquitination de Met4p n'entraîne pas sa dégradation mais inhibe son activité d'activateur de transcription (Kaiser et al., 2000).

L'hypothèse voulant qu'Iip1p soit une protéine F-box, est appuyée par les études de microscopie à fluorescence qui démontrent la localisation cytoplasmique de la protéine Gfp-Iip1. Ce résultat concorde avec la localisation de certaines protéines du complexe SCF telle Skp1 qui peut se localiser aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau (Teng-Umnuay et al., 1998). De plus, le rôle d'Iip1p n'étant pas d'être impliquée dans le transport des protéines tel Imp2, supporte l'hypothèse voulant qu'Iip1 puisse être une protéine F-box.

Nos résultats ne décèlent aucune différence entre l'ubiquitination des protéines d'une souche sauvage et d'un mutant *iip1*. Cependant, nous n'avons pas démontré hors de tout doute qu'Iip1 n'est pas une protéine F-box. En effet, nous savons qu'Imp2p joue un rôle dans une multitude de phénomènes cellulaires allant de la résistance à la bléomicine au métabolisme du maltose. Il est donc possible qu'Iip1p soit impliquée dans l'ubiquitination d'Imp2p lors de conditions bien précises. Dans un tel cas, il serait possible que nos résultats ne soulignent aucune variation dans l'ubiquitination d'Imp2p,

car les souches utilisées n'ont pas poussé dans conditions favorisant son ubiquitination.

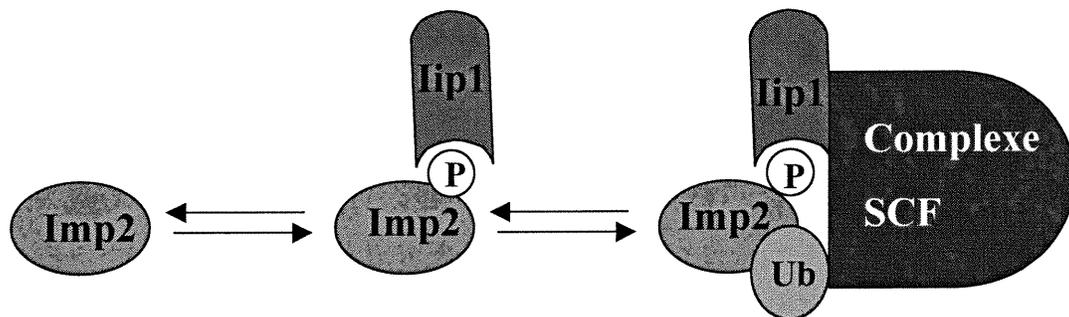
Étant donné qu'Imp2p régule des gènes impliqués lors de la raréfaction du glucose (Lodi et al., 1995), il serait intéressant de vérifier l'ubiquitination de cette protéine lorsque la culture de levure entre en phase stationnaire. C'est dans cette phase que la levure doit peut-être changer l'activité d'Imp2p par l'ubiquitination pour pouvoir utiliser d'autres sources de carbone tel l'éthanol à cause de la déplétion du glucose.

Il fut souvent rapporté que certaines protéines ciblées par les protéines F-box devaient être préalablement phosphorylées. C'est le cas de la protéine Sic1 qui lie la protéine F-box Cdc4 exclusivement lorsqu'elle est phosphorylée (voir introduction). Un autre exemple est celui de la protéine F-box Grr1 qui lie seulement la forme phosphorylée des cyclines 1 et 2 (Skowyra et al., 1997). Enfin, le facteur de transcription Met4 peut lui aussi être phosphorylé, mais il ne fut pas démontré que la phosphorylation était nécessaire à sa liaison avec la protéine Met30 (Kaiser et al., 2000).

Si la différence entre les poids moléculaires d'His-Imp2p du mutant *iip1* et de la souche sauvage s'avère être due à la phosphorylation, ceci pourrait constituer une évidence supportant qu'*iip1* soit une protéine F-box. Afin de vérifier si Imp2p peut être phosphorylée, il faudrait traiter des extraits protéiques de la souche sauvage contenant la protéine His-Imp2 avec l'enzyme phosphatase lambda. Si His-Imp2p est phosphorylée, la phosphatase enlèvera les groupements phosphates et le nouveau poids moléculaire d'His-Imp2p sera comparable à celui synthétisé par les mutants *iip1*. Il serait ensuite très intéressant de vérifier par mutagenèse dirigée si la phosphorylation d'Imp2p a lieu dans

son domaine R/S et si la forme phosphorylée d'Imp2p est essentielle à l'interaction avec Iip1p comme c'est le cas pour plusieurs protéines F-box et leurs substrats.

Si Imp2 est une protéine pouvant se faire phosphoryler, nous avons une hypothèse pour expliquer la variation de son poids moléculaire en l'absence d'Iip1p. Comme le démontre la figure 4.1, nous croyons que chez la souche sauvage la présence de phosphate sur Imp2p est protégée par la liaison d'Iip1p. C'est donc la liaison des deux protéines qui empêcherait des phosphatases encore non-identifiées d'enlever les phosphates de la protéine Imp2. En l'absence d'Iip1p, les phosphatases auraient accès aux groupements phosphates et leur clivages réduiraient le poids moléculaire d'Imp2p.



**Figure 4.1 Modèle de l'inactivation de l'activité d'Imp2.**

Selon notre modèle, l'inactivation d'Imp2p se fait en deux étapes. Tout d'abord, Imp2p se fait phosphoryler (P) par une kinase encore inconnue. Ce phosphate sera reconnu par Iip1p qui liera Imp2p et les autres protéines du complexe SCF afin d'ubiquitiner Imp2p. Les flèches indiquent que les différentes étapes de l'ubiquitination sont réversibles. Chez la levure de type sauvage, Iip1 empêche le clivage du phosphate augmentant ainsi le poids moléculaire d'Imp2p. En l'absence d'Iip1p, des phosphatases clivent les phosphates associés à Imp2p abaissant le poids moléculaire de celle-ci.

## 5- CONCLUSION :

En conclusion, nos résultats ont permis pour la première fois de tracer un croquis du rôle potentiel d'Iip1p. Nous croyons qu'Iip1 est une protéine F-box dont la fonction est d'ubiquitiner à l'aide du complexe SCF certains substrats spécifiques, tel Imp2p. Nous avons démontré qu'Imp2p et Iip1p étaient capables d'interagir entre eux, mais le mécanisme selon lequel Iip1p reconnaît Imp2p est encore inconnu. Des résultats préliminaires ne vont pas à l'encontre de l'hypothèse qu'une phosphorylation d'Imp2p permettrait l'interaction avec Iip1p comme c'est le cas pour plusieurs F-box et leurs substrats.

À ce stade des recherches, nous ne savons toujours pas pourquoi l'absence d'Iip1p entraîne la formation de *petites*. Une analyse des protéines interagissant avec Iip1p révélera, selon nous, de nouvelles protéines essentielles au maintien de la stabilité des mitochondries chez *Saccharomyces cerevisiae*. Nous croyons que la perte des mitochondries est directement responsable de la sensibilité des mutants *iip1* au stress oxydant plutôt que de croire que l'absence d'Iip1p entraîne l'inactivation d'une voie anti-oxydante impliquant des facteurs tel le glutathion.

Enfin, pour mieux comprendre le phénomène de la résistance à la bléomycine, il est impératif de bien caractériser la structure d'Imp2p ainsi que les autres protéines

impliquées dans sa régulation. Une fois ce défi relevé, il faudra vérifier si l'humain possède des protéines ayant des rôles semblables et développer des stratégies autour de ces protéines clés pour éviter que les cellules tumorales humaines deviennent résistantes à la bléomycine.

## **6- BIBLIOGRAPHIE :**

Ames, B. N., and Shigenaga, M. K. (1992). Oxidants are a major contributor to aging. *Ann N Y Acad Sci* 663, 85-96.

Andronikashvili, E. L., Mosulishvili, L. M., Belokobilski, A. I., Kharabadze, N. E., Tevzieva, T. K., and Efremova, E. Y. (1974). Content of some trace elements in sarcoma M-1 DNA in dynamics of malignant growth. *Cancer Res* 34, 271-4.

Aruoma, O. I., Halliwell, B., and Dizdaroglu, M. (1989). Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem* 264, 13024-8.

Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276, 1709-12.

Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86, 263-74.

- Basu, A. K., Wood, M. L., Niedernhofer, L. J., Ramos, L. A., and Essigmann, J. M. (1993). Mutagenic and genotoxic effects of three vinyl chloride-induced DNA lesions: 1,N6-ethenoadenine, 3,N4-ethenocytosine, and 4-amino-5-(imidazol-2-yl)imidazole. *Biochemistry* 32, 12793-801.
- Benamira, M., Johnson, K., Chaudhary, A., Bruner, K., Tibbetts, C., and Marnett, L. J. (1995). Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* 16, 93-9.
- Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313-6.
- Blakely, W. F., Fuciarelli, A. F., Wegher, B. J., and Dizdaroglu, M. (1990). Hydrogen peroxide-induced base damage in deoxyribonucleic acid. *Radiat Res* 121, 338-43.
- Boiteux, S. (1993). Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of *Escherichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J Photochem Photobiol B* 19, 87-96.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

Breen, A. P., and Murphy, J. A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18, 1033-77.

Burger, R. M. (1998). Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycine. *Chemical Review* 98, 1153-1169.

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

Chanock, S. J., el Benna, J., Smith, R. M., and Babior, B. M. (1994). The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 269, 24519-22.

Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O., and Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282, 699-705.

Collins, A. R. (1999). Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21, 238-46.

Contamine, V., and Picard, M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 281-315.

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

Delaunay, A., Isnard, A. D., and Toledano, M. B. (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J* 19, 5157-66.

Demple, B. (1996). Redox signaling and gene control in the Escherichia coli soxRS oxidative stress regulon--a review. *Gene* 179, 53-7.

Dexter, D. T., Carter, C. J., Wells, F. R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., and Marsden, C. D. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52, 381-9.

Dizdaroglu, M. (1991). Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* 10, 225-42.

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

Dumond, H., Danielou, N., Pinto, M., and Bolotin-Fukuhara, M. (2000). A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast. *Mol Microbiol* 36, 830-45.

Enenkel, C., and Wolf, D. H. (1993). BLH1 codes for a yeast thiol aminopeptidase, the equivalent of mammalian bleomycin hydrolase. *J Biol Chem* 268, 7036-43.

Featherstone, C., and Jackson, S. P. (1999). DNA double-strand break repair. *Curr Biol* 9, R759-61.

Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C., and Struhl, K. (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol* 17, 6982-93.

Ferrando, A. A., Velasco, G., Campo, E., and Lopez-Otin, C. (1996). Cloning and expression analysis of human bleomycin hydrolase, a cysteine proteinase involved in chemotherapy resistance. *Cancer Res* 56, 1746-50.

- Fisk, H. A., and Yaffe, M. P. (1999). A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *145*, 1199-208.
- Foote, C. S. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* *54*, 659.
- Foury, F., and Cazzalini, O. (1997). Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett* *411*, 373-7.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* *11*, 4241-57.
- Gatignol, A., Durand, H., and Tiraby, G. (1988). Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett* *230*, 171-5.
- Gaudu, P., Moon, N., and Weiss, B. (1997). Regulation of the soxRS oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR in vivo. *J Biol Chem* *272*, 5082-6.
- Gershoni, J. M., and Palade, G. E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* *131*, 1-15.

Girard, P. M., and Boiteux, S. (1997). Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie* 79, 559-66.

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

Grant, C. M., MacIver, F. H., and Dawes, I. W. (1996). Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 29, 511-5.

Grant, C. M., MacIver, F. H., and Dawes, I. W. (1997). Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 410, 219-22.

Guthrie, C., Fink, G. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (San Diego: Academic Press).

Gutteridge, J. M. (1994). Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 738, 201-13.

He, C. H., Masson, J. Y., and Ramotar, D. (1996). Functional mitochondria are essential for *Saccharomyces cerevisiae* cellular resistance to bleomycin. *Curr Genet* 30, 279-83.

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

Hershko, A. (1997). Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 9, 788-99.

Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.

Hochstrasser, M., Johnson, P. R., Arendt, C. S., Amerik, A., Swaminathan, S., Swanson, R., Li, S. J., Laney, J., Pals-Rylaarsdam, R., Nowak, J., and Connerly, P. L. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-proteasome system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 1513-22.

Holmgren, A. (2000). Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal* 2, 811-20.

Holmgren, A., and Bjornstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 252, 199-208.

Ibeas, J. I., and Jimenez, J. (1997). Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts. *Appl Environ Microbiol* 63, 7-12.

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

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

Joenje, H. (1989). Genetic toxicology of oxygen. *Mutat Res* 219, 193-208.

Jordan, A., Aragall, E., Gibert, I., and Barbe, J. (1996). Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* *nrdEF* operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol Microbiol* 19, 777-90.

Jordan, A., Aslund, F., Pontis, E., Reichard, P., and Holmgren, A. (1997). Characterization of *Escherichia coli* *NrdH*. A glutaredoxin-like protein with a thioredoxin-like activity profile. *J Biol Chem* 272, 18044-50.

Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., and Reed, S. I. (2000). Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* 102, 303-14.

Kappus, H., and Sies, H. (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* 37, 1233-41.

Kistler, M., Summer, K. H., and Eckardt, F. (1986). Isolation of glutathione-deficient mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 173, 117-20.

Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., and Nomoto, A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* 21, 6139-50.

Kuge, S., Toda, T., Iizuka, N., and Nomoto, A. (1998). Crm1 (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells* 3, 521-32.

Kumar, R. C., Anthrayose, C. V., Iyer, K. V., Vimala, B., and Shashidhar, S. (2001). Lipid peroxidation and diabetic retinopathy. *Indian J Med Sci* 55, 133-8.

Lebedev, A. V., Levitsky, D. O., Loginov, V. A., and Smirnov, V. N. (1982). The effect of primary products of lipid peroxidation on the transmembrane transport of calcium ions. *J Mol Cell Cardiol* 14, 99-103.

Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., and Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233, 346-57.

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

Lisowsky, T. (1993). A high copy number of yeast gamma-glutamylcysteine synthetase suppresses a nuclear mutation affecting mitochondrial translation. *Curr Genet* 23, 408-13.

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

Lundstrom, J., and Holmgren, A. (1990). Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J Biol Chem* 265, 9114-20.

Machado, A. K., Morgan, B. A., and Merrill, G. F. (1997). Thioredoxin reductase-dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *272*, 17045-54.

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

Masson, J. Y., and Ramotar, D. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* IMP2 gene encodes a transcriptional activator that mediates protection against DNA damage caused by bleomycin and other oxidants. *Mol Cell Biol* *16*, 2091-100.

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

Matthews, J. R., Wakasugi, N., Virelizier, J. L., Yodoi, J., and Hay, R. T. (1992). Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* *20*, 3821-30.

Mitchell, D. A., and Sprague, G. F., Jr. (2001). The phosphotyrosyl phosphatase activator, Ncs1p (Rrd1p), functions with Cla4p to regulate the G(2)/M transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *21*, 488-500.

Moriya, M., and Grollman, A. P. (1993). Mutations in the mutY gene of *Escherichia coli* enhance the frequency of targeted G:C-->T:a transversions induced by a single 8-oxoguanine residue in single-stranded DNA. *Mol Gen Genet* 239, 72-6.

Newcomb, T., and Loeb, L. (1998). DNA Damage and Repair, Vol 1: DNA Repair in Prokaryotes and Lower eukaryotes, J. Nickoloff and M. Hoekstra, eds. (Totowa, NJ: Humana Press Inc.).

Obe, G., Johannes, C., and Schulte-Frohlinde, D. (1992). DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7, 3-12.

Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G., and Nicotera, P. (1989). Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 10, 281-5.

Patton, E. E., Willems, A. R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K. L., and Tyers, M. (1998). Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev* 12, 692-705.

Pedrajas, J. R., Kosmidou, E., Miranda-Vizueté, A., Gustafsson, J. A., Wright, A. P., and Spyrou, G. (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274, 6366-73.

Petering, D. H., Byrnes, R. W., and Antholine, W. E. (1990). The role of redox-active metals in the mechanism of action of bleomycin. *Chem Biol Interact* 73, 133-82.

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

Richter, C. (1987). Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids* 44, 175-89.

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

Schauenstein, E., and Esterbauer, H. (1978). Formation and properties of reactive aldehydes. *Ciba Found Symp*, 225-44.

Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M. D., and Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79, 233-44.

Sharma, K. G., Sharma, V., Bourbouloux, A., Delrot, S., and Bachhawat, A. K. (2000). Glutathione depletion leads to delayed growth stasis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of a partially overlapping role for thioredoxin. *Curr Genet* 38, 71-7.

Sikic, B. I., Rosencweig, M., Carter, S. K. (1985). Bleomycin Chemotherapy (Orlando: Academic Press).

Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91, 209-19.

Sugiyama, M., Thompson, C. J., Kumagai, T., Suzuki, K., Deblaere, R., Villarroel, R., and Davies, J. (1994). Characterisation by molecular cloning of two genes from *Streptomyces verticillus* encoding resistance to bleomycin. *Gene* 151, 11-6.

Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitsui, A., Kondo, N., Matsui, H., Hamuro, J., Brown, N., Arai, K., Yokota, T., Wakasugi, H., and et al. (1989). ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *Embo J* 8, 757-64.

Teng-umnuay, P., Morris, H. R., Dell, A., Panico, M., Paxton, T., and West, C. M. (1998). The cytoplasmic F-box binding protein SKP1 contains a novel pentasaccharide linked to hydroxyproline in *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 273, 18242-9.

Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 503-32.

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

Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., and Rothberg, J. M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623-7.

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

Vongsamphanh, R., Fortier, P. K., and Ramotar, D. (2001). Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Mol Cell Biol* 21, 1647-55.

Wakasugi, N., Tagaya, Y., Wakasugi, H., Mitsui, A., Maeda, M., Yodoi, J., and Tursz, T. (1990). Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8282-6.

Wills, E. D. (1971). Effects of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 123, 983-91.

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

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

Zoladek, T., Tobiasz, A., Vaduva, G., Boguta, M., Martin, N. C., and Hopper, A. K. (1997). MDP1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in mitochondrial/cytoplasmic protein distribution, is identical to the ubiquitin-protein ligase gene RSP5. *Genetics* 145, 595-603.