

Université de Montréal

**Déficiences dans la réparation par excision de nucléotides
en phase S induite par la séquestration du facteur de
réplication RPA**

par

Jean-Philippe Angers

Université de Montréal

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en biologie moléculaire

Décembre 2015

© Jean-Philippe Angers, 2015

Résumé

Mots-clés : Réparation par excision de nucléotides, Rayons UV, Dommages à l'ADN

Introduction Les lésions induites par les rayons UV peuvent causer des blocages dans la réplication de l'ADN. Ces dommages sont éliminés par le processus moléculaire très conservé de réparation par excision de nucléotides (NER). Nous avons précédemment démontré que la protéine ATR, une kinase majeure impliquée dans le stress réplicatif, est requise pour une NER efficace, et ce exclusivement durant la phase S. Des résultats subséquents ont suggéré que ce prérequis n'était pas lié à la réponse induite par ATR, mais plutôt d'une conséquence globale causée par la présence de stress réplicatif. En ce sens, nous mettons l'emphase qu'après irradiation UV, le complexe RPA joue un rôle crucial dans l'activation des mécanismes de NER ainsi que dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées.

Hypothèses: En général, les mutations qui confèrent une augmentation du stress réplicatif engendrent une séquestration excessive du facteur RPA aux fourches de réplication bloquées ce qui réduit son accessibilité pour le NER.

Méthodes et résultats: Le modèle de la levure a été choisi pour vérifier cette hypothèse. Nous avons développé un essai de NER spécifique à chacune des phases du cycle cellulaire pour démontrer que les cellules déficientes en Mec1, l'homologue d'ATR, sont déficientes dans la réparation par excision de nucléotides spécifiquement en phase S. De plus, plusieurs autres mutants de levure, caractérisés par un niveau de dommages spontanés élevé, ont aussi exhibé un défaut similaire. Ces mutants ont démontré une fréquence et une intensité de formation de foyers de RPA plus élevée. Finalement, une diminution partielle de RPA dans les levures a induit un défaut significatif dans le NER spécifiquement durant la phase S.

Conclusion: Nos résultats supportent la notion que la séquestration de RPA aux fourches de réplication endommagées durant la phase S prévient son utilisation pour la réparation par excision de nucléotides ce qui inhibe fortement l'efficacité de réparation. Cette étude chez la levure facilite l'élucidation du phénomène analogue chez l'humain et, ultimement, comprend des implications majeures dans la compréhension du mécanisme de développement des cancers UV-dépendants.

Abstract

Keywords : Nucleotide excision repair, UV rays, DNA damage response

Introduction Replication-blocking UV-induced DNA adducts are removed by the highly-conserved nucleotide excision repair (NER) pathway. We previously demonstrated that ATR kinase, a preeminent responder to replicative stress, is required for efficient NER exclusively during S phase. Subsequent data suggested that this requirement is not a manifestation of ATR signaling *per se*, but rather more broadly reflects some consequence of replication stress. In this respect we emphasize that after UV treatment, heterotrimeric RPA plays essential and independent roles in both NER and restart of blocked replication forks.

Hypothesis: In general, mutations which confer increased replicative stress engender excessive sequestration of RPA at blocked replications forks which in turn reduces the availability of this factor for NER.

Methods and Results: The powerful yeast model was chosen to address this hypothesis. We developed a cell-cycle-specific DNA repair assay to demonstrate that cells deleted for Mec1, the yeast ATR homolog, are defective in S phase-specific NER. Moreover several other yeast mutants, i.e., ones characterized by elevated levels of spontaneous DNA damage, exhibited a similar defect. These mutants also displayed increased frequency and intensity of RPA focus formation. Finally, degron-mediated depletion of RPA in wild-type cells resulted in significant inhibition of NER uniquely during S.

Conclusion: Our data support the notion that RPA sequestration at blocked replication forks in yeast undergoing high levels of replication stress abrogates NER during S phase. This work in yeast facilitates elucidation of the analogous phenomenon in humans and, ultimately, harbours implications for understanding the mechanism of UV-associated skin cancer development.

Table des matières

Résumé.....	II
Abstract.....	III
Table des matières.....	IV
Liste des figures.....	VI
Liste des abréviations.....	VII
Remerciements.....	X
Introduction: La réponse aux dommages à l'ADN.....	11
Les types de dommages à l'ADN.....	12
La provenance des dommages à l'ADN.....	12
La réparation des dommages à l'ADN.....	20
La réparation des lésions induites par les rayons UV.....	21
Les mécanismes de tolérance.....	25
La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.....	27
Le cycle cellulaire chez la levure.....	27
Le modèle de la levure : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
Hypothèse.....	36
Objectifs.....	36
Matériel et Méthodes.....	37
Culture cellulaire.....	37
Irradiation aux rayons UV.....	37
Détection par immunoblots de type western.....	38
Quantification du contenu en ADN par cytométrie en flux.....	38
Quantification de l'élimination des CPD par cytométrie en flux.....	38
Quantification de l'élimination des CPD par slotblot.....	39
Analyse par microscopie à fluorescence.....	39
Résultats.....	40

Développement d'un essai de quantification du NER.....	40
Le mutant <i>mec1Δ sml1Δ</i> possède un défaut de NER spécifiquement durant la phase S.....	43
Le défaut de NER observé en phase S dépend de l'initiation de la réplication	47
Plusieurs mutants possédant du stress réplcatif ont un défaut de NER en phase S	48
Les cellules ayant un défaut de NER en phase S ont une augmentation de foyers RPA.....	52
Une diminution partielle de la quantité de RPA induit un défaut de NER spécifiquement durant la phase S	56
La surexpression de la sous-unité RPA1 est létale chez la levure	59
Discussion.....	62
Conclusion	66
Bibliographie.....	i
Annexe 1	i
Annexe 2 - Table des souches de levures	iii

Liste des figures

Figure 1. Divers types de dommages à l'ADN.....	12
Figure 2. Structure moléculaire d'une 8-oxoG.....	13
Figure 3. Représentation d'une déamination.....	15
Figure 4. Représentation d'une dépurination.....	15
Figure 5. Formation d'un CPD suite à une irradiation UV.....	18
Figure 6. La réparation par excision de nucléotides chez la levure.....	23
Figure 7. Quantification de l'élimination des CPD par cytométrie en flux.....	42
Figure 8. Le mutant.....	46
Figure 9. Le défaut de NER en phase S dépend de l'initiation de la réplication.....	48
Figure 10. Une variété de mutants sensibles au stress réplcatif possèdent un défaut de NER spécifiquement en phase S.....	52
Figure 11. Les mutants déficients en NER durant la phase S ont une quantité plus importante de foyers RPA.....	55
Figure 12. Une déplétion partielle de la quantité de RPA induit un défaut de NER spécifiquement durant la phase S.....	58
Figure 13. La surexpression des sous-unités de RPA est létale.....	61

Liste des abréviations

53BP1 - p53-binding protein 1
6-4PP - 6-4 photoproduit
8-oxoG - 8-oxoguanine
Ace2 - Activation of CUP1 expression 2 protein
ADN - Acide désoxyribonucléique
ARN - Acide ribonucléique
ARNm - ARN messenger
ARNpII - ARN polymérase 2
ATM - Ataxia telangiectasia mutated protein
ATP - Adénosine triphosphate
ATR - Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
ATRIP - ATR interacting protein
BER - Réparation par excision de base
CDC# - Cell division cycle protein #
CDK - Kinase cycline-dépendante
Chk# - Checkpoint kinase #
Clb# - Cycline B #
Cln# - Cycline N #
CPD - Dimère de pyrimidine
CS - Syndrome Cockayne
CSA - Cockayne syndrome A
CSB - Cockayne syndrome B
Cul4A - Cullin 4 A
Dbf4 - Dumbell Former 4 protein
DDB# - DNA damage binding protein #
DDC - DNA damage checkpoint
DDC2 - DNA damage checkpoint protein 2
DDK - Dbf4-dépendant kinase

DDR - DNA damage response
DNA-PK - DNA-dependant protein kinase
Dpb11 - DNA polymerase B (II)
DSB - Bris double brins
ERCC1 - Excision Repair Cross-Complementation Group 1
Fkh# - Fork head homolog #
GG-NER - Global genome nucleotide excision repair
GINS - *go-ichi-ni-san* protein complex (Slf5, Psf1, Psf2, and Psf3)
H2AX - Histone H2A membre X
HMGN1 - High Mobility Group Nucleosome Binding protein 1
HR - Recombinaison homologue
Hus1 - HydroxyUrea Sensitive protein 1
LIG1 - Ligase 1
Mbp1 - MluI-box binding protein 1
MCM - Minichromosome maintenance
Mcm1 - Minichromosome maintenance protein 1
Mdc1 - Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
Mec1 - Mitosis entry checkpoint protein 1
MGMT - O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MMR - Mismatch repair
MMS - Méthyle méthane sulfonate
NAD⁺ - Nicotinamide adénine dinucléotide
Nbs1 - Nibrin protein 1
Ndd1 - Nuclear division defective protein 1
NER - Réparation par excision de nucléotides
O⁶-Cl-ethylG - O6-2-chloroéthyleguanine
ORC - Complexe de reconnaissance des origines
PARP - Poly-ADP-ribose polymérase
PCNA - Proliferating cell nuclear antigen
POLH - Polymérase eta
Rad# - Radiation sensitive protein #

RFA - Replication factor A
ROS - Réactifs d'oxygènes
RPA - Replication protein A
Rpd3 - Reduced potassium dependency protein 3
Sic1 - Subunit inhibitor of cyclin-dependent protein kinase 1
Sir2 - Silent information regulator protein 2
Sld# - Synthetically lethal with Dpb11-1
SSB - Bris simple brin
Swi# - Switching deficient protein #
TC-NER - Transcription-coupled NER
Tel1 - Telomere maintenance protein 1
TFIIH - Transcription factor II Human
TLS - Synthèse de translésion
TS - Template switching
TTD - Trichothiodystrophie
USP7 - Ubiquitin specific peptidase 7
UV - Ultraviolet
UVSSA - UV-stimulated scaffold protein A
XAB2 - XPA binding protein 2
XP - Xeroderma pigmentosum
XPV - XP-variant
Yhp1 - Yeast homeo-protein 1
Yox1 - Yeast homeobox protein 1

Remerciements

Je remercie tous les gens qui m'ont aidé à arriver où je suis maintenant ainsi que tous les gens que j'ai pu côtoyer au cours de mes quelques années à Montréal. Je remercie aussi les gens qui ont su m'apporter tout le support nécessaire afin de progresser encore plus loin.

Je tiens à remercier les Dr Hugo Wurtele et Dr Elliot Drobetsky de m'avoir accepté dans leur laboratoire et de m'avoir permis de développer grandement mes compétences en tant que scientifique.

J'aimerais aussi remercier le Dr François Bélanger pour m'avoir transmis son savoir-faire ainsi que sa patience à m'expliquer les aspects techniques plus compliqués. Son aide m'a été vraiment précieuse et je lui en suis vraiment reconnaissant.

Introduction: La réponse aux dommages à l'ADN

Le matériel génétique qui est transféré à travers les générations dépend d'une structure située à l'intérieur de nos cellules, la double hélice d'ADN. Nos cellules sont constamment assaillies par des agents externes et internes pouvant les endommager engendrant des problèmes fonctionnels. L'étude présente développe un aspect encore méconnu de cette relation induction-réparation de dommages. Cette thèse rapporte des résultats menant à l'élucidation du rôle de la séquestration du facteur de réplication RPA impliqué, en autres, dans les mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN. Cette étude propose un modèle expliquant le défaut d'élimination des 6-4PP et des CPD observé spécifiquement durant la phase S chez des fibroblastes humains possédant une anomalie dans l'expression de la kinase ATR ainsi que dans une variété de lignées de mélanomes humains (Auclair et al., 2008; Bélanger et al., 2014). Ce modèle propose aussi une explication pour le défaut de NER spécifique à la phase S observé dans les cellules XPV et solidifie l'hypothèse postulée selon laquelle l'absence de résolution des fourches de réplifications endommagées aurait d'importantes implications dans cette inhibition de réparation (Auclair et al., 2010). La grande majorité de cette étude a été effectuée dans le modèle de levure *Saccharomyces cerevisiae* afin d'utiliser son énorme potentiel génétique pour faciliter la production de cellules déficientes dans les divers aspects de la réparation ainsi que pour sa facilité d'utilisation. De plus, les mécanismes de réparation par excision de nucléotides étant presque identiques entre l'humain et la levure, les résultats obtenus faciliteront ensuite l'élucidation du mécanisme homologue humain.

Les types de dommages à l'ADN

Il existe une grande variété de lésions pouvant affecter une cellule. Certaines ont le potentiel d'induire des dommages au niveau de l'ADN. Ces dommages proviennent de plusieurs sources différentes et la plupart induiront de graves complications dans le maintien de l'intégrité de l'ADN s'ils ne sont pas résolus.

La provenance des dommages à l'ADN

L'ADN peut être endommagé de plusieurs façons. Il existe des facteurs qui proviennent du métabolisme de la cellule, dit dommages endogènes, et d'autres qui proviennent de l'extérieur, dit dommages exogènes.

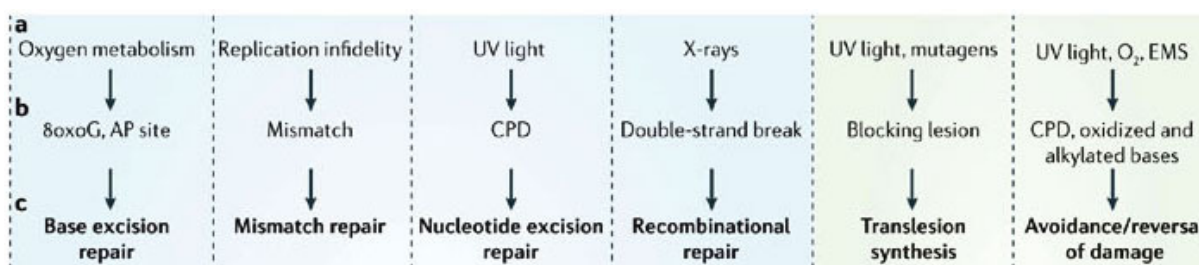


Figure 1. Divers types de dommages à l'ADN

Les dommages endogènes

Les dommages endogènes sont souvent considérés comme la principale cause de mutation dans les cellules à cause de leur nature délétère (Nakamura et al., 1998). Ces dommages résultent souvent d'une réaction énergétique entre l'ADN et certains produits du métabolisme cellulaire. Cette interaction engendre des modifications causant des changements à la structure de l'ADN. À ce jour, une variété de voies métaboliques ont été identifiées pouvant être impliquées dans la formation de dommages à l'ADN; les réponses hydrolytiques, l'exposition à des produits réactifs de l'oxygène et les erreurs causées lors de la réplication de l'ADN en sont quelques exemples (Swenberg et al., 2011).

Les mésappariements de base surviennent lors de la réplication de l'ADN; lorsque la polymérase introduit une mauvaise base changeant la séquence de l'ADN résultant en une lecture inadéquate de l'information génétique. Heureusement, les polymérases de réplication

de l'ADN (les polymérase alpha, delta et epsilon) ont une efficacité de réplication très élevée. De plus, les polymérase delta et epsilon ont développé des mécanismes d'assurance-qualité permettant de garantir l'insertion adéquate des bases (Brutlag and Kornberg, 1972; Hopfield, 1974). Cette réaction permet à ces deux polymérase de reculer sur le brin d'ADN pour corriger une base mésappariée, l'éliminer puis y insérer la base appropriée. Cependant, même si les bases sont bien insérées, elles restent susceptibles à certaines réactions chimiques pouvant modifier leur structure. Par exemple, la respiration cellulaire produit une grande quantité de dérivés réactifs à l'oxygène (ROS), molécules très réactives contenant des groupements d'oxygène (Fortini et al., 2003). Ce sont des métabolites cellulaires normaux utiles pour plusieurs mécanismes cellulaires, dont la signalisation intracellulaire (Dröge, 2002). Le principal ROS est le superoxyde (O_2^-), produit résiduel de la respiration cellulaire. Sous cette forme, le superoxyde est toxique pour la cellule c'est pourquoi il est modifié par l'enzyme superoxyde dismutase qui le transforme, en autres, en peroxydes d'hydrogènes (H_2O_2), une forme beaucoup moins toxique pour la cellule. En situation de stress cellulaire, une augmentation importante de la production de ces métabolites peut survenir et engendrer une réactivité non spécifique avec les bases de l'ADN (Murphy, 2009). Cette interaction produit des complexes anormaux sur l'ADN, le plus connu étant la 8-oxoguanine (8-oxoG) (Fortini et al., 2003).

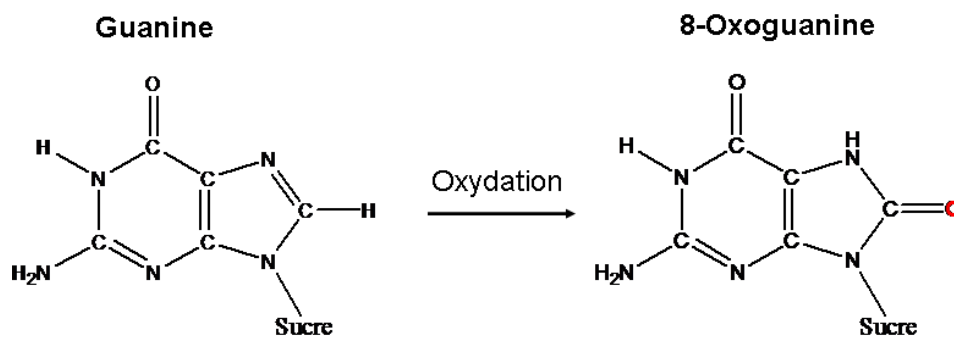


Figure 2. Structure moléculaire d'une 8-oxoG

L'ADN est aussi sujet à des modifications chimiques spontanées affectant directement sa structure. Le lien moléculaire entre la base et le désoxyribose de l'ADN est labile et peut être détruit suite à une augmentation de température ou encore être ciblé par des réactions

hydrolytiques (Gates, 2009). L'élimination de ce lien mène à la formation de sites abasiques. Ces lésions sont reconnues et réparées efficacement par les enzymes de réparation par excision de bases (BER) (Dianov et al., 2003). La formation de ces lésions est problématique puisque, si elles ne sont pas réparées avant le début de la réplication ou de la transcription, la polymérase favorisera le dépôt d'une adénine face à ces sites abasiques, sans préoccupation de la base originale (Zhou and Doetsch, 1993; Strauss, 2002).

L'ADN peut aussi être la cible de réactions hydrolytiques au niveau de ses amines. Dans un contexte cellulaire normal, l'hydrolyse des cytosines solubles permet la production d'uraciles pour la formation d'ARN (West, 2000). Dans un contexte anormal, par exemple lors d'une mutation dans une enzyme hydrolytique qui changerait leur spécificité, les cytosines de l'ADN ainsi que leurs formes modifiées, les 5-méthylcytosines, peuvent être ciblées menant ultimement à la formation de sites abasiques (Waters and Swann, 2000). Puisqu'il ne devrait pas y avoir d'uracile sur l'ADN, des enzymes très efficaces, les uracile-ADN glycosylases, viendront les éliminer formant un site abasique qui sera ensuite réparé par BER (Dianov et al., 2003). Par contre, la déamination d'une 5-méthylcytosine mènera à la formation d'une thymine qui ne sera pas reconnu par le même complexe d'enzymes. Cette déamination changeant la base résultante, ce sera plutôt le mécanisme de réparation de mésappariements qui sera recruté (Lindahl, 1993).

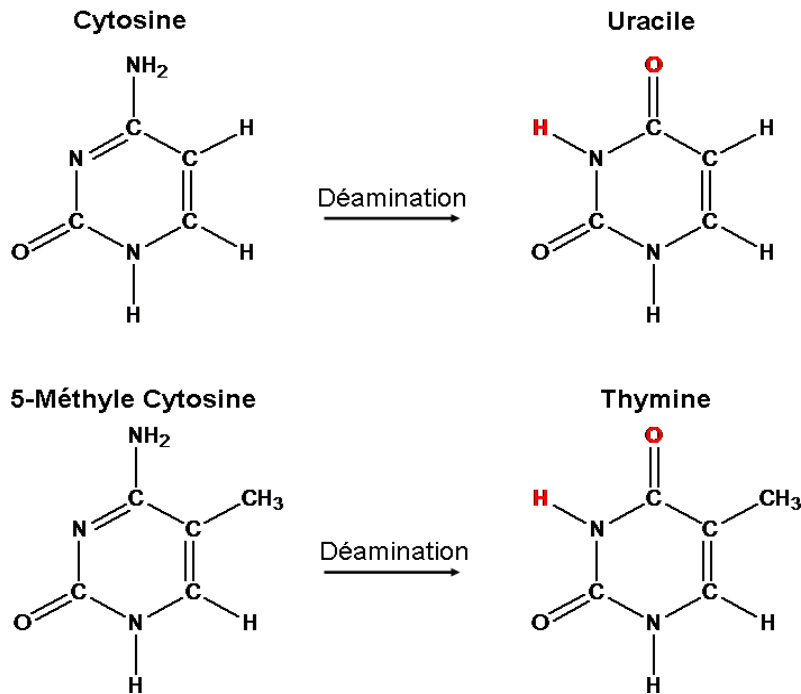


Figure 3. Représentation d'une déamination

L'hydrolyse peut aussi survenir au niveau des bases purines. Toutefois, cette réaction est beaucoup moins fréquente. L'hydrolyse des adénines en hypoxanthines formera un lien xanthine-cytosine plutôt qu'adénine-thyrosine, formant ainsi une liaison mutagénique A-C (Karran and Lindahl, 1980). Puisque cette réaction est moins fréquente, l'enzyme de réparation, les hypoxanthines-ADN glycosylases, est en très faible quantité, restreignant l'efficacité de réparation (Hill-Perkins et al., 1986).

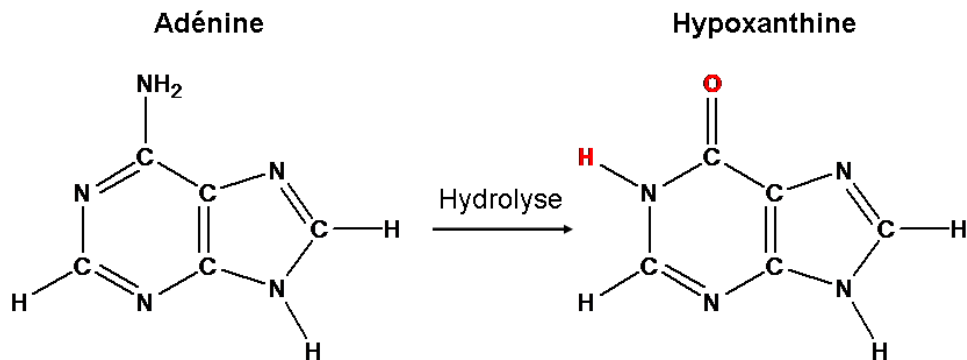


Figure 4. Représentation d'une dépurination

En plus des dommages éliminant des sections d'ADN, il existe des dommages qui vont résulter d'un ajout de résidus sur les bases de l'ADN. L'un de ces types, les alkylations, sont fréquentes sur les bases d'ADN. Il s'agit du transfert d'un groupe carboné, le plus fréquent est le groupement méthyle. Ces modifications sont normales pour la cellule et ont un rôle dans la régulation des gènes et le bon fonctionnement cellulaire (Compere and Palmiter, 1981). Dans le cas d'une méthylation, ce sera les enzymes ADN-méthyletransférases qui seront responsables de ce transfert sur l'ADN, plus spécifiquement sur des adénines et des cytosines (Bird, 1992). Cependant, il arrive que l'ajout d'un groupement se produise à des endroits inadéquats formant ainsi des structures anormales bloquant ou inhibant fortement la réplication de l'ADN (Stern et al., 2000). Cette hyperméthylation peut résulter en la formation d'une chromatine plus dense favorisant un état de répression des gènes (Baylin and Herman, 2000). En plus des agents produits métaboliques, il existe aussi des agents chimiques externes à la cellule pouvant endommager l'ADN.

Les dommages exogènes

Même si la cellule réplique parfaitement son ADN, qu'elle évite et répare tous les dommages pouvant être causés par son propre métabolisme, elle reste sujette à son environnement.

Une grande quantité d'agents chimiothérapeutiques utilisés de nos jours ont comme cible l'ADN (Cheung-Ong et al., 2013). Certains de ces produits chimiques vont promouvoir le transfert de groupements alkyles sur les bases de l'ADN. Ceux-ci vont entraver fortement la lecture de l'information génétique lors de la réplication (Groth et al., 2010). Un exemple de ces agents alkylants est la moutarde azotée, nom donné à un groupe de molécules possédant une réactivité avec l'ADN et favorisant le dépôt d'un groupement alkyle sur les guanines formant des 7-alkylguanine (Povirk and Shuker, 1994). Malgré la grande quantité d'agents connus pouvant induire ces réactions, seulement quelques uns sont utilisés chez l'humain à cause de leur aspect très carcinogéniques. Le méthylméthane sulfonate (MMS) est aussi un agent alkylant très puissant. Sa toxicité est tellement élevée qu'il est impossible de l'utiliser en chimiothérapie. Cependant, il est utilisé comme modèle de mutagène en laboratoire (Lundin et al., 2005). Son mécanisme d'action est similaire aux autres agents alkylants, celui-ci favorise

le transfert d'un groupement méthyle principalement sur les guanines, formant des 7-méthyleguanine, ou sur les adénines, formant des 3-méthyleadénine. Cette forme modifiée de la guanine se lie à une thymine plutôt qu'une cytosine (Beranek, 1990).

Des groupements de plus haut poids moléculaire peuvent aussi être transférés sur l'ADN. Par exemple, les groupements chloroéthyle sont transférés de façon très similaire aux groupements alkyles formant, en autres, des O⁶-chloroéthyle-guanines (O⁶Cl-ethylG) suite à une réaction avec une guanine. Ceux-ci ont la particularité d'avoir une réactivité plus grande que les groupements méthyles et engendre des réarrangements qui favorisent l'interaction avec les cytosines voisines. Ces interactions peuvent se former entre deux brins opposés formant des liens covalents entre ces deux brins d'ADN, appelés liens réticulents interbrins (Fu et al., 2012). Le cisplatine possède lui aussi la capacité de créer ce type de liens. Quoique son mode d'action soit très similaire aux agents alkylants, il ne possède pas de groupements alkyles à transférer (Kelland, 2007). Les liaisons intrabrins viendront affecter la structure de l'ADN alors que les liaisons interbrins viendront empêcher la séparation de ceux-ci lors de la réplication de l'ADN et empêcheront la complétion normale du cycle cellulaire.

Certaines molécules ont aussi la capacité de s'intégrer entre les brins d'ADN à cause de leur nature hydrophobe souvent conférée par la présence de structures aromatiques (Hendry et al., 2007). Certaines molécules produites par les cellules, comme les hormones, ont une structure similaire à la structure résultant d'un lien entre deux bases adjacentes sur l'ADN (Snyder et al., 2006). Cette intercalation normale des hormones semble avoir un effet de signalisation et de régulation des réponses hormonales (Hendry et al., 1998). Il existe des molécules chimiques se basant sur une structure similaire, le bromure d'éthidium en est un exemple. Sa présence entre les brins d'ADN inhibe fortement le mouvement des polymérase lors de la réplication de l'ADN. Il est utilisé comme marqueur d'ADN en laboratoire, mais a déjà été utilisé comme agent chimiothérapeutique (McMurray and van Holde, 1986).

Les produits chimiques ne sont pas les seuls types d'agents pouvant endommager l'ADN. Les rayons ionisants, comme les rayons X, possèdent une énergie élevée pouvant être transmise à l'ADN perturbant les liens chimiques du brin d'ADN résultant en des bris (Gulston et al., 2002; Parplys et al., 2012). Cette énergie peut aussi être transmise aux molécules d'eau avoisinantes, formant des radicaux d'hydroxyle qui peuvent endommager

l'ADN. Les rayons ultraviolets, possédant une énergie plus faible, peuvent aussi causer des dommages à l'ADN. Ce sont les principaux agents mutagéniques utilisés pour ce mémoire et une section leurs est réservée plus bas. Les rayons UV de plus haute intensité sont assez énergétiques pour catalyser la formation de liens covalents entre deux bases adjacentes (Huang and Li, 2013). Les rayons de basse énergie vont plutôt transférer cette énergie aux chromophores, molécules possédant la capacité d'absorber l'énergie UV. Ces molécules actives réagiront alors avec l'oxygène environnant formant des molécules d'oxygènes singulet très réactif (Alscher et al., 1997). L'effet des rayons UV le plus étudié est la formation des dimères de pyrimidines (CPD) et des 6-4-photoproduits (6-4 PP) (Friedberg et al., 2006; Schreier et al., 2015). Ces lésions produisent des structures anormales sur le brin d'ADN qui déforment l'allure régulière de l'hélice ce qui bloque la processivité des polymérase. Ces distortions sont reconnues et réparées rapidement par le mécanisme de réparation par excision de nucléotides.

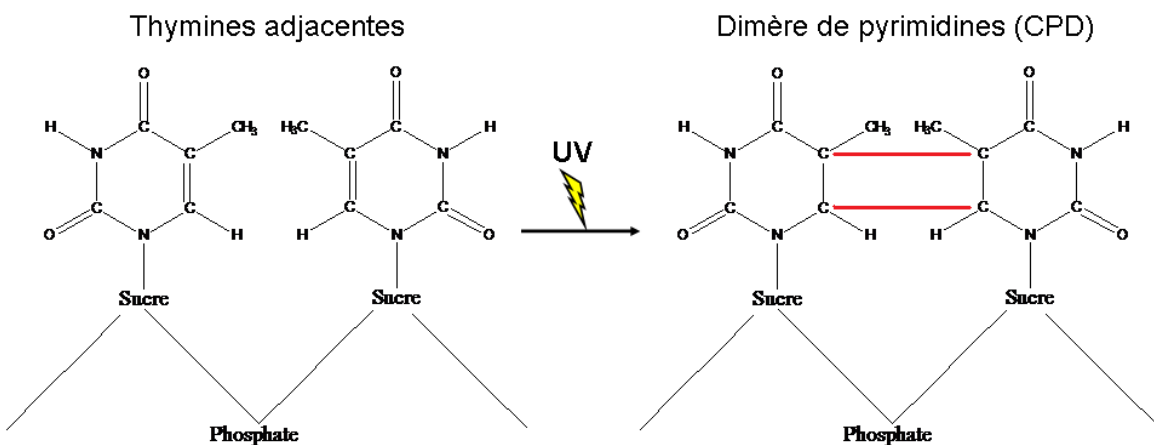


Figure 5. Formation d'un CPD suite à une irradiation UV

Les rayons ultraviolets

Comme il a été mentionné plus tôt, les rayons UV sont de puissants agents mutagéniques. Cependant, ce ne sont pas tous les types de rayons UV qui sont dangereux, certaines sous-classes ont même des effets bénéfiques pour la santé humaine par exemple pour la production de vitamine D (Holick, 2008). La source la plus importante de rayons UV est le

soleil. La grande majorité des rayons émis sont absorbés par la couche d'ozone, mais certains atteignent la surface de la terre. Les UVA sont les rayons ayant la plus grande longueur d'ondes et arrivent à franchir la barrière d'ozone. Ils ont la capacité de percer la peau et peuvent donc être absorbés par les cellules (Rastogi et al., 2010). Les UVA sont la cause principale du vieillissement de la peau via leur action de dégradation du tissu conjonctif cutané. Ils étaient considérés, jusqu'à maintenant, comme peu dangereux pour la santé, tant que l'exposition restait faible, n'ayant pas d'impact direct sur l'ADN (Alscher et al., 1997). Cependant, de nouvelles études ont démontré que les UVA pouvaient avoir des réactions indirectes sur l'ADN via des mécanismes de photosensibilisation (Smith et al., 2012). Ils peuvent aussi favoriser la production de réactifs d'oxygènes dans les cellules. Les UVB peuvent aussi percer la peau, mais ne pénètrent que très peu. Ce sont ces rayons qui sont responsables des coups de soleil. Ils ont une longueur d'onde plus courte, donc de plus forte intensité, mais sont absorbés en grande majorité par la couche d'ozone. Ce sont ces rayons qui causent la majorité des symptômes liés aux dommages induits par les rayons UV (Lee et al., 2013). Finalement, les UVC provenant du soleil ne se rendent pas à la surface de la terre étant bloqués par la couche d'ozone. Ils ne sont normalement pas rencontrés par nos cellules. Cela n'empêche pas que ce sont les rayons UVC qui sont le plus utilisés en laboratoire pour simuler l'effet des rayons UV puisqu'ils sont plus facilement produits et qu'ils ont des longueurs d'ondes similaires à celle de l'absorption optimale de l'ADN favorisant le transfert d'énergie. De plus, la longueur d'onde utilisée pour produire les UVC en laboratoire est la plus éloignée de la longueur d'onde d'absorption des protéines ce qui réduit considérablement l'absorption non spécifique, les dommages ainsi produits sont donc propres à l'ADN (Batista et al., 2009).

Ces mutations peuvent donc engendrer des blocages tant lors de la réplication que de la transcription de l'ADN. Il est donc impératif de les réparer efficacement afin d'éviter d'empirer cette situation problématique qui peut mener jusqu'à la mort cellulaire.

Les bris dans l'hélice d'ADN

Les cassures simples brins (SSB) sont occasionnées fréquemment dans le génome, de l'ordre de 10 000 lésions par jour par cellule (Caldecott, 2008) (Hoeijmakers, 2009). Elles sont souvent le plus souvent occasionnées par les dépurinations, les dépyrimidinations, les

hydrolyses de bases de l'ADN ou encore suite à l'effet des réactifs d'oxygènes. La grande majorité de ces cassures simples brins sont rapidement réparées, mais quelques unes subsistent. La présence d'une lésion simple brin résulte le plus souvent en un blocage de la réplication ou de la transcription dans les cellules qui ne sont pas en phase de prolifération. Les cassures simples brins sont reconnues par des enzymes senseurs, par exemple la poly-(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1), qui stimule la réparation par excision de bases. Une accumulation de cassures simples brins mène à une activité prolongée des PARPs et promouvoit la déplétion des molécules signalétiques telles que les NAD⁺ et l'ATP. Cette déplétion engendre l'activation des facteurs pro-apoptotiques qui mènera, au final, à la mort cellulaire (Caldecott, 2008).

La présence de SSBs dans l'hélice d'ADN déstabilise sa structure chimique. Cette faiblesse prédispose l'hélice à des cassures plus importantes, les cassures doubles brins (DSB). Ces dommages sont parmi les plus toxiques pour la cellule puisque cette situation laisse place à des réarrangements chromosomiques s'ils ne sont pas réparés de façon adéquate (Richardson and Jasin, 2000). À cause de la nature très toxique et mutagénique des DSB, ces dommages peuvent favoriser l'apparition d'instabilité génomique, point culminant dans le développement de maladies génétiques tels les cancers. (Khanna and Jackson, 2001).

Heureusement, les cellules humaines ont développé une multitude de mécanismes de reconnaissance et de réparation pour contrer la grande majorité de ces dommages, du plus simple mésappariement à la cassure double brin beaucoup plus complexe.

La réparation des dommages à l'ADN

Plusieurs voies de signalisations différentes sont à l'œuvre dans la réponse aux dommages à l'ADN (DDR). La première étape pour résoudre la présence de dommages à l'ADN est la détection de la lésion. Lorsque la cellule détecte la présence d'un problème, plusieurs cascades de signalisation s'activent pour mettre en branle les systèmes de réparation (Craven et al., 2002). Ces voies de signalisation sont activées pour limiter les dommages collatéraux via l'induction d'un arrêt au niveau du cycle cellulaire et permettre à la machinerie de réparation d'effectuer son travail (Jossen and Bermejo, 2013).

Suite à cette détection, un mécanisme de réparation dépendant du type de lésion détecté sera utilisé pour réparer le dommage. Par exemple, lors d'un dommage à l'ADN de type méthylation, il existe des enzymes capables de directement renverser la liaison produite entre la base de l'ADN et le groupement ajouté, comme la méthyle guanine méthyle transférase (MGMT) (Christmann et al., 2011). Lors de dommages ponctuels, ce sera le mécanisme de réparation par excision de base qui sera à l'œuvre (BER). Pour des dommages qui agiront sur la structure de l'ADN, comme la distorsion d'hélice causé par des dommages aux rayons UV, ce sera plutôt la réparation par excision de nucléotide (NER). Il existe aussi les mécanismes de réparation de mésappariement (MMR) qui sont activés lors d'une insertion fautive d'une base sur l'ADN (Caldecott, 2008). Lors de dommages double brins, ce seront les mécanismes de recombinaison homologue (HR) et de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) qui seront principalement activés (Dudás and Chovanec, 2004; Lieber, 2010). Dans la situation où la réparation est inefficace ou incomplète, des mécanismes de mort cellulaire seront plutôt activés et permettront ainsi d'éviter de proliférer les mutations aux cellules filles (Elmore, 2007). Dans certains cas exceptionnels, des mécanismes de tolérance permettent à la cellule d'ignorer une lésion mineure et permet de poursuivre la réplication sans réparer le défaut à proprement dit.

La réparation des lésions induites par les rayons UV

Le principal mécanisme de réparation des dommages modifiant la structure de l'hélice d'ADN, comme ceux causés par les rayons UV, est la voie de réparation par excision de nucléotides (NER) (Sinha and Häder, 2002). Découvert en 1964 par R. B. Setlow and W. L. Carrier (Setlow and Carrier, 1964) suivant les recherches de P.C. Hanawalt (Pettijohn and Hanawalt, 1963), cette voie de réparation est toujours aussi exhaustivement étudiée à ce jour. Ce mécanisme est très bien conservé à travers tous les eucaryotes, il est donc possible de l'étudier dans la plupart des modèles cellulaires pour aider à élucider le mécanisme chez l'humain (de Laat et al., 1999). Cela est important puisque même si les grandes lignes du mécanisme sont connues, plusieurs aspects moléculaires restent à être élucidés.

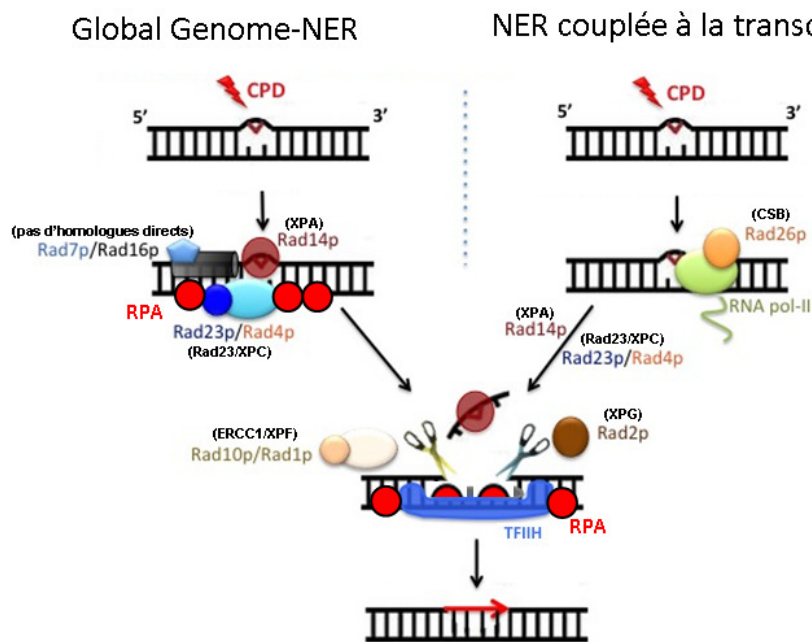
La voie de signalisation du NER se sous-divise en deux sous-voies qui diffèrent uniquement par leur méthode de reconnaissance des lésions. Le premier type de

reconnaissance survient lors de la transcription; la polymérase à ARN II (ARNpII) activée arrive à une base endommagée et reste bloquée à cause de la structure anormale dans l'hélice d'ADN causée par une lésion (Fousteri and Mullenders, 2008). Ne pouvant pas poursuivre la transcription, des mécanismes de détresse vont être activés pour signaler un problème à la cellule. Ce signal favorisera la mise en marche de la cascade de signalisation via l'activation des protéines effectrices humaines Cockayne Syndrome A et B (CSA, CSB) (*S.cerevisiae* homologues Rad28 et Rad26 respectivement) (Saijo, 2013; Taschner et al., 2010; Zhang et al., 2012). C'est cette méthode de reconnaissance dépendante de la transcription que l'on nomme la réparation par excision de nucléotides couplée à la transcription (TC-NER). CSA possède la capacité de se lier à l'ARNpII hyperphosphorylée, situation qui survient lorsqu'elle reste bloquée à un site de dommage. Le rôle exact de CSB reste à être élucidé et plusieurs hypothèses ont été rapportées. L'idée générale est que CSB aide à remodeler l'ADN entourant l'ARNpII lors d'un arrêt causé par une lésion (Fousteri and Mullenders, 2008). Ces protéines vont ensuite recruter une panoplie de protéines dont XAB2, HMG1, USP7 et UVSSA. Le rôle exact de certaines de ces protéines reste cependant incompris. Il a été récemment démontré que XAB2 avait la possibilité de se lier à ARNpII ainsi qu'à CSA et CSB ce qui pourrait lui permettre d'agir comme protéine d'échafaudage et favoriser la liaison des protéines subséquentes (Nakatsu et al., 2000). Un rôle similaire a été supposé pour la protéine UVSSA (Schwertman et al., 2013). HMG1 a été identifiée comme ayant un rôle de modificateur post-traductionnel d'histones H3 ce qui pourrait avoir un rôle dans le recrutement des autres protéines de NER et augmenter l'efficacité de réparation (Birger et al., 2003). USP7 est une déubiquitineuse qui peut interagir avec p53, un suppresseur de tumeur majeur chez l'humain (Schwertman et al., 2012). Son rôle de déubiquitination est important pour permettre la stabilisation de p53 et ainsi promouvoir la réparation de l'ADN et favoriser un arrêt cellulaire. Il a aussi été démontré que USP7 pouvait déubiquitiner XPC, Rad4 chez la levure, une protéine majeure du système de reconnaissance du NER, ce qui permettait d'éviter la dégradation de XPC/Rad4 et promouvait la réparation (He et al., 2014).

La deuxième méthode de reconnaissance repose sur un scan constant de l'ADN par un complexe de protéines, XPC et Rad23b (*S.cerevisiae* homologues Rad4 et Rad23) qui reconnaissent les distorsions dans l'hélice d'ADN partout dans le génome (Melis et al., 2011).

Lors de la reconnaissance d'un dommage, ce complexe recrutera le complexe de protéines UV-DDB-Cul4A (contenant les protéines DDB1, DDB2 et Cul4A) ce qui favorisera la dissociation entre Rad23b et XPC via l'activité ubiquitine ligase de Cul4A. Cette dissociation permet l'ouverture de l'hélice d'ADN et rend visible la lésion pour les complexes de réparation par NER (Li et al., 2006; Liu et al., 2009). Ce mécanisme de reconnaissance se nomme *global genome* NER (GG-NER).

Suite à la liaison de ces facteurs, les étapes successives sont identiques pour les deux mécanismes. La liaison des protéines XPA et RPA (Rad14 et RFA chez la levure) agiront comme vérificateur final de la présence d'une lésion (Camenisch and Nägeli, 2008; Vasquez et al., 2002). Le facteur de transcription TFIIH, plus précisément les sous-unités XPB et XPD (Rad25 et Rad3 chez *S.cerevisiae*), deux hélicases, favorisera l'ouverture de l'ADN (Coin et al., 2007; Fuss and Tainer, 2011). Il y aura ensuite recrutement des endonucléases XPG (Rad2) et XPF-ERCC1 (Rad1-Rad10) qui viendront exciser l'ADN de chaque côté de la lésion pour enlever les bases endommagées (Houtsmuller et al., 1999; O'Donovan et al., 1994; Park and Sancar, 1994). Finalement, il y aura synthèse d'un nouveau brin d'ADN à l'aide des polymérase δ et ϵ puis ligation grâce à la ligase LIGI (Paul-Konietzko et al., 2015).



Adapté de: Conconilab: NER and Heterochromatin

Figure 6. La réparation par excision de nucléotides chez la levure

La grande majorité de ces protéines sont nécessaires au bon fonctionnement du mécanisme de réparation et une déficience en l'une ou l'autre peut impliquer des complications majeures pouvant amener, en autres, à une sensibilité aux rayons UV et à une augmentation d'occurrence de cancers chez l'humain.

Les maladies humaines reliées à une déficience en NER

Chez l'humain, le mécanisme de réparation par excision de nucléotides est le seul mécanisme connu pour éliminer les lésions causées par les rayons UV (Bélanger et al., 2014). Il va de soit qu'un manque dans une des étapes de réparation peut impliquer des conséquences majeures. Une déficience en NER confère une sensibilité accrue aux rayons UV. Trois maladies rares sont reconnues pour avoir un lien direct avec cette déficience, Xeroderma Pigmentosum (XP), le syndrome Cockayne (CS) et la Trichotriodystrophie (TTD) (Lehmann, 2003).

Xeroderma Pigmentosum est une maladie autosomale récessive caractérisée par une sensibilité extrême aux rayons du soleil et une augmentation de près de 1000 fois plus élevée des risques de développer des cancers de la peau. Les patients atteints de XP ont une mutation conférant un défaut d'expression dans l'un des gènes codant pour l'une des 7 protéines XP-A à XP-G ou encore une mutation dans la polymérase de translésion, polymérase eta, impliquée dans la tolérance aux dommages induits par les UV (Masutani et al., 1999). Cette maladie n'affiche pas tout à fait les mêmes symptômes que les patients XP, c'est pourquoi il se nomme XP-variant (XPV). Cependant, il a été démontré dans une étude récente qu'il existait un lien important entre la polymérase eta et le NER puisque les cellules XPV affichaient un défaut de NER important strictement durant la phase S (Auclair et al., 2010). La raison de ce défaut spécifique à la phase du cycle cellulaire est l'une des bases principales de ce mémoire. La meilleure façon d'améliorer son sort est d'éviter le plus possible l'exposition aux rayons UV puisqu'il n'existe aucun traitement à ce jour. Heureusement, cette maladie a une fréquence relativement basse de 1 sur 250 000 individus. L'un des aspects moins compris de la maladie est le développement de problèmes neurologiques chez certains patients, plus précisément le développement d'un retard mental (Berneburg and Lehmann, 2001; DiGiovanna and Kraemer,

2012). Le lien possible existant entre le développement neuronal et la réparation par NER reste à être identifié.

Le syndrome Cockayne est aussi une maladie autosomale récessive. Elle porte certains symptômes similaires à la maladie XP. En ce sens, les patients ont une sensibilité accrue aux rayons du soleil et développent des problèmes neurologiques graves. Cependant, l'une des caractéristiques qui la distingue de XP est sa fréquence dite normale d'occurrence de cancers de la peau, les patients atteints de CS ne sont pas plus sujets à développer de cancers (Venema et al., 1990). Ce sont des mutations dans les gènes CSA et CSB qui sont responsables de la maladie, deux protéines impliquées dans la reconnaissance par TC-NER. Le pronostic est peu favorable, la grande majorité des gens ne survivant pas plus de 20 ans. Il n'existe malheureusement pas de traitement pour cette maladie.

La trichotriodystrophie est, comme les deux autres maladies, autosomale récessive. Cette maladie est similaire aux deux autres, mais peut se sous-classer en deux catégories, les patients dits photosensibles et non photosensibles (Stefanini, 2000). Les patients photosensibles ont souvent des mutations dans les gènes des sous-unités du facteur de transcription TFIIH, facteur impliqué dans la réplication ainsi que dans la réparation de l'ADN. Ce sont principalement les gènes XPB, XPD et TTDA qui sont affectés, 3 sous-unités du facteur de transcription TFIIH. Certains résultats semblent supposer que ce soit une mutation qui affecterait la quantité du facteur TFIIH et non une mutation dans son activité qui serait la cause de cette maladie diminuant ainsi sa disponibilité dans la cellule (Stefanini, 2000). Comme chez les patients atteints de CS, les patients atteints de TTD n'ont pas d'occurrence plus élevée de cancers de la peau. Ils ont cependant les mêmes symptômes neurodégénératifs.

Les mécanismes de tolérance

Des mécanismes de tolérance sont présents permettant à la cellule de survivre en présence d'une faible quantité de dommages à l'ADN (Ghosal and Chen, 2013). Même s'il existe les mécanismes de réparation, ce ne sont pas toutes les lésions qui sont réparées à temps. Les mécanismes de tolérance vont plutôt essayer de contourner le problème grâce à des mécanismes complexes nécessitant des polymérases spéciales dont la polymérase η chez

l'humain (Makridakis and Reichardt, 2012). Malheureusement, les mécanismes dictant le choix de la réparation à utiliser sont mystérieux. Dans la situation où les mécanismes de tolérance sont favorisés, deux voies différentes peuvent être utilisées, la voie de synthèse de translésion (TLS) ou encore la voie de commutation de brins (TS). La cellule prend le risque d'introduire des mutations ponctuelles afin d'éviter de bloquer complètement la réplication. Ces mécanismes peuvent sembler favoriser la mutagénèse, mais certaines des polymérases spécialisées ont une aptitude surprenante à reconnaître les structures endommagées et à y introduire les bases adéquates (Waters et al., 2009). Ce sont les polymérases de la famille Y qui sont les principaux acteurs de la TLS, plus spécifiquement les polymérases eta, kappa, iota et zeta ainsi que la polymérase REV1 de la famille B (Sale et al., 2012). La plus intéressante pour ce mémoire est la polymérase eta (POLH) qui possède la capacité de reconnaître les lésions causées par les rayons UV. Cette polymérase spécialisée reconnaît la structure anormale des dimères de pyrimidines et a la capacité d'introduire les bases complémentaires de façon très efficace. Elle possède une structure légèrement différente des polymérases de réplication régulières ce qui lui permet d'interagir promptement avec la structure créée par un CPD (Cruet-Hennequart et al., 2010). Le déroulement exact de l'évitement de la lésion n'est pas clair. Cependant, l'hypothèse générale est que la polymérase de réplication est remplacée par l'une des polymérase de translésion lorsque celle-ci reste bloquée au niveau du site de dommage, la polymérase de translésion pourra introduire les bases adéquates devant la lésion. Finalement, il y aura retour de la polymérase de réplication et la poursuite normale de la réplication de l'ADN (Friedberg et al., 2005). Une caractéristique importante de la polymérase eta est son rôle dans le développement du syndrome XP-variant (XPV), discuté plus bas (Lehmann et al., 1975). Jusqu'à tout récemment, une déficience en POLH impliquait une inhibition dans la réponse par translésion, mais n'avait pas de lien direct avec la réparation des lésions à proprement dit. Il a été démontré qu'une déficience en POLH impliquait un défaut de réparation par excision de nucléotides, mécanisme de réparation des CPDs, uniquement durant la phase S (Auclair et al., 2010). Cette étude suggère un lien existant entre ces deux mécanismes qui serait dépendant de l'impossibilité de résoudre les fourches de réplication bloquées. Un aspect important de ce mémoire vise à comprendre l'impact d'une déficience à résoudre ces blocages dans les fourches de réplication.

La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN

En plus de la réponse moléculaire de réparation des dommages à l'ADN, une réponse cellulaire est activée afin de ralentir ou de bloquer la progression à travers le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire chez la levure

Dans des conditions normales, la cellule se divisera pour donner naissance à deux cellules filles. La division cellulaire est un processus qui repose sur l'activation et l'inhibition de protéines à différents stades lors du cycle cellulaire. Ce cycle se divise en 4 grandes phases incluant aussi une phase hors-cycle. Un cycle commencera normalement par une cellule dite au repos, en phase G₀. Durant cette phase, la cellule est très active au niveau de la transcription. La machinerie de réplication est démantelée et les cyclines sont désactivées favorisant un état dépourvu de division cellulaire. La plupart des cellules ne passent pas par cette phase et restent plutôt dans la phase active du cycle cellulaire. Il sera plutôt question d'une phase G₁ plus longue et non d'un arrêt complet de la division. C'est suite à l'activation de cyclines ainsi que de kinases cyclines-dépendantes (CDK) que la cellule peut démarrer l'entrée dans le cycle cellulaire. Ce sont des variations dans les niveaux de cyclines qui vont favoriser la progression à travers ce cycle. À partir de là, la cellule entrera en phase G₁ où elle synthétisera les protéines et ARNm nécessaires pour une division cellulaire. Chez la levure, la protéine cdk1 est l'unité principale de progression. Cette kinase, aidée de plusieurs cyclines dont Cln1, Cln2 et Cln3, permettent la régulation de la progression à travers la phase G₁ afin d'atteindre la phase S. La kinase Cdc28 est aussi importante pour l'accentuation du via l'interaction avec Cln3. Cette interaction favorise la production des protéines Cln1 et Cln2 grâce à l'activation des complexes de modification de l'ADN Swi4 et Swi6. Cln1 et Cln2 peuvent, eux-aussi, interagir avec Cdc28 et favorisent leur propre production, amplifiant ainsi le signal. Cette augmentation importante dans l'activité des Cln-Cdc28 incite la transition vers la phase S (Sherr, 1994). C'est durant la phase S que la cellule répliquera son contenu en ADN et doublera complètement son information génétique. Ce sont les complexes de protéines MCB et SBF, formés des protéines Mbp1, Swi4 et Swi6, qui seront accrus en fin de phase G₁ ce qui initiera le point de non retour et l'entrée en phase S (Bähler, 2005). La phase S étant une partie très importante de cette thèse, une section plus détaillée lui est consacrée plus bas.

Suite au dédoublement de l'ADN, la cellule entrera en phase G2, phase où elle dupliquera les métabolites cellulaires afin que chacune des cellules filles obtiennent l'entièreté du contenu cellulaire pour assurer leur survie. Plusieurs facteurs importants aident à la progression au travers de cette phase. Les facteurs Fkh1 et Fkh2 sont des facteurs de transcription nécessaires à cette progression. Ceux-ci interagissent avec la protéine Mcm1 au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la régulation de la phase G2 (Kumar et al., 2000). La protéine Ndd1, un autre facteur de transcription, jouera le rôle de co-activateur pour favoriser la synthèse de ces gènes (Koranda et al., 2000). Cette activation induira la transcription des cyclines Clb1 et Clb2, les principales cyclines impliquées dans la transition vers la phase M du cycle cellulaire (Zhu et al., 2000). Durant cette phase, la cellule agglomérera les deux copies de son ADN en chromosome pour les ségréger de façon parfaitement partagée, une copie de chaque chromosome à chacune des cellules filles. La phase de mitose est, elle aussi, régulée par la protéine Mcm1 via l'activation du complexe Swi4 et de la cycline Cln3 (McInerny et al., 1997). De plus, deux protéines, Yox1 et Yhp1, sont nécessaires à la progression de la phase M, car elles inhibent la transcription des gènes antérieurs des autres phases du cycle cellulaire, forçant la cellule à aller de l'avant (Pramila et al., 2002). Finalement, deux facteurs de transcription, Ace2 et Swi5, vont être régulés durant la phase M. Swi5 se verra accumulé par relocalisation au niveau du noyau ce qui promouvoit la transcription des gènes reliés à la transition mitotique comme l'inhibiteur de CDK, Sic1 (Toyn et al., 1997). Ace2 a un rôle similaire à Swi5, les deux protéines étant très près structurellement (Butler and Thiele, 1991). Il y aura ultimement cytokinèse et production de deux cellules filles (Malumbres and Barbacid, 2009). Cette coupure est régulée principalement par la modulation et la localisation de l'actine, des septines et des microtubules formant un anneau contractant la cellule à son milieu. Une panoplie de protéines est impliquée, mais l'une d'elle joue le rôle de maestro, Cdc42. Cette protéine régule presque tous les aspects de la cytokinèse, de la polarisation cellulaire à l'organisation de l'actine (Bi and Park, 2012). Au final, deux cellules seront produites, chacune possédant une copie de chaque entité cellulaire.

Les arrêts cellulaires

Dans un contexte où il y a présence de dommages à l'ADN, la cellule peut arrêter à divers endroits au travers du cycle cellulaire pour permettre à la machinerie de bien réparer toutes les lésions, c'est ce que l'on appelle les mécanismes de point de contrôle ou *DNA damage checkpoints* (DDC) (Neecke et al., 1999). Ils sont cruciaux dans la survie cellulaire afin d'éviter de répliquer un ADN endommagé et perdurer les dommages au travers des générations de cellules. Cependant, ce ne sont qu'aux points de transition entre les phases que la cellule peut vraiment arrêter complètement la progression du cycle. Il existe trois régions connus d'arrêt cellulaire, le premier est présent entre la phase G1 et S (point de contrôle G1/S), le deuxième se situe environ au milieu de la phase S (intra-S) et le dernier se situe à la frontière entre la phase G2 et M (point de contrôle G2/M).

L'activation des points de contrôle dépend normalement de la reconnaissance des dommages par les différents mécanismes de réparation, mais des mécanismes d'activation indépendants ont été découverts. Plus précisément, suite au ralentissement de la réplication de l'ADN (MacDougall et al., 2007). De plus, ATR/Mec1 est activé durant la phase S afin de réguler l'activation des origines de réplication (Shechter et al., 2004). Lors de l'activation du point de contrôle suivant la reconnaissance d'un dommage, une cascade de signalisation s'ensuit. Le complexe 9-1-1, formé des protéines Rad9, Hus1 et Rad1 chez l'humain et des protéines Rad17, Mec3 et Ddc1 chez la levure est activé. Il est similaire au complexe PCNA, unité essentielle dans la processivité de la réplication (Puđu et al., 2008). Il est recruté au niveau des sites de dommages par un complexe de facteurs de réplication (Parrilla-Castellar et al., 2004). C'est cette liaison avec le complexe 9-1-1 qui favorise le recrutement des kinases majeures du DDC. Il agit comme échafaud pour les protéines transducteurs du signal du point de contrôle. Suite au dépôt du complexe 9-1-1, deux protéines majeures sont activées chez la levure, Mec1 et Tel1 (Beyer and Weinert, 2014). Ce sont des protéines-kinases extrêmement importantes dans le transfert du signal à travers la cellule via la phosphorylation d'une panoplie de protéines effectrices dont Mrc1 et Rad53 (Chen and Zhou, 2009). L'activation des transducteurs de signal dépend principalement du type de lésion reconnu.

Dans le cas d'une lésion causée par les rayons UV, plus précisément suite à la formation de produits tel qu'un CPD, ce sera principalement la kinase Mec1 qui sera activée (Stiff et al., 2006). La présence de dommage induit un arrêt dans la machinerie de réplication. Par contre, l'hélicase continue à dérouler l'ADN. Cette distorsion cause la formation d'une grande séquence d'ADN simple brin qui se recouvre rapidement de la protéine RPA. Cette accumulation est reconnue par le complexe Mec1-Ddc2. Une co-activation de la kinase Tel1 sera aussi présente via la transduction du signal par Mec1 afin d'amplifier le signal. Chez la levure, c'est l'interaction entre Mec1, Ddc2 et le complexe 9-1-1 qui sera le principal activateur du point de contrôle. Suite à l'activation du *checkpoint*, plus d'une centaine de protéines seront phosphorylées l'une d'elles étant une autre protéine-kinase, Rad53 (Sanchez et al., 1996). Suite à son activation, Rad53 a la possibilité de s'autophosphoryler et ainsi soutenir l'activation du signal (Pelliccioli et al., 1999). Chez la levure, Chk1 et Rad53 iront affecter les protéines du cycle cellulaire, plus précisément les protéines favorisant la division cellulaire CDC25A, CDC25B et CDC25C et ainsi encourager un arrêt cellulaire temporaire pour permettre la réparation (Bartek and Lukas, 2003). De plus, Chk1 et Rad53 joueront un rôle dans le blocage de l'activation des fourches tardives qui ne sont pas encore activées (Yekezare et al., 2013). Les CDC25 sont des phosphatases qui éliminent les phosphates inhibiteurs sur les kinases cycline-dépendantes (CDK), ce qui les active (Cangi et al., 2000). Lorsqu'elles sont activées, les CDK favoriseront les transitions à travers chacune des étapes du cycle cellulaire, une inhibition en réduit donc la progression (Lew and Kornbluth, 1996).

La réplication de l'ADN

Les cellules doivent transmettre leur information génétique à chaque division. Il est primordial qu'à chaque fois que la cellule copie son ADN, celui-ci soit dupliqué de façon parfaite et sans erreurs pour éviter d'introduire des mutations dans les cellules filles. Toutefois, il arrive qu'une mutation se produise dans un gène et que celle-ci induise une amélioration dans la protéine formée. Par sélection naturelle, cette mutation peut être valorisée par rapport à la version non mutée, on parlera alors d'une mutation évolutive qui peut, ou non, être maintenue dans les génomes futurs. Lors de la réplication, des mécanismes complexes sont en jeu pour ouvrir le brin double de l'ADN, lire et copier chacun des brins. La réplication

de l'ADN se divise en trois étapes, l'initiation, l'élongation et la terminaison. Les mécanismes de réplifications sont très bien conservés à travers l'évolution et les informations recueillies chez les procaryotes et eucaryotes unicellulaires ont été extrêmement importantes pour déceler le mécanisme homologue chez l'humain. L'une des différences entre ces mécanismes est présente dans les méthodes de détection des origines de répllication (Bell and Dutta, 2002). Ces origines sont des endroits spécifiques prédéterminés à travers le génome comme lignes de départ de la répllication. Certaines sont activées tout au début alors que d'autres sont activées plus tard vers la fin de la phase S. Chez l'humain, il n'existe pas de séquence consensus connue pour délimiter une origine de répllication (Masai et al., 2010). Par contre, chez la levure, il existe une région reconnue qui semble être utilisée fréquemment. Cette région, variable entre 11 et 17 paires de base, est reconnue par un complexe nommé complexe de reconnaissance d'origine de répllication (ORC) (Palzkill and Newlon, 1988). Cependant, cette séquence ne représente qu'une mineure partie des régions d'initiation de la répllication. Il existe donc plusieurs critères encore énigmatiques pour la reconnaissance de ces sites. La structure de l'ADN semble avoir un rôle important dans le recrutement des ORC. Les enzymes de remodelages de l'ADN jouent un rôle crucial afin de changer la structure solide de l'ADN double brin en ADN simple brin plus accessible à la machinerie de répllication. Chez la levure, la protéine CDC6 agit sur l'ORC pour faciliter la reconnaissance des origines via le remodelage de l'ADN grâce à son activité ATPase (Speck and Stillman, 2007). En plus des ORC, un autre complexe est très important pour l'initiation de la répllication, le complexe de maintenance de minichromosomes (MCM) (Tye, 1999). Ce complexe compte plusieurs sous-unités qui forment l'hélicase, l'enzyme déroulant l'ADN. Lorsqu'elle est jumelée à l'ORC, ils forment le complexe de pré-répllication. C'est grâce à l'enzyme Cdt1 que ceux-ci s'unissent (Rialland et al., 2002). Ce complexe se forme au début de la phase G1 aux endroits d'initiation reconnus et ce seront certains de ces sites qui seront activés par les enzymes d'élongation pour débiter la répllication de l'ADN. Parmi ces enzymes, les CDK et les kinases Dbf-dépendantes (DDK) sont les plus importantes (Masai et al., 2010). Elles possèdent la capacité d'activer le complexe de pré-répllication au tout début de la phase S. Les composantes exactes nécessaires à l'activation de la répllication sont encore peu développées. Parmi celles identifiées, les protéines Sld2 et Sld3 sont phosphorylées par les CDK pour permettre l'initiation de la répllication (Tanaka et al., 2007). Cette phosphorylation va permettre la liaison avec la protéine

Dpb11. La formation du complexe Sld2-Sld3-Dpb11 est essentielle à l'assemblage et l'activation de l'hélicase MCM (Boos et al., 2011). Ensuite, le complexe multiprotéique GINS interagit avec Dpb11 et Sld3. Cette interaction favorise le recrutement de la kinase CDC45 (Zou and Stillman, 2000), une protéine importante dans le recrutement de plusieurs protéines d'élongation dont RPA, la polymérase alpha et PCNA (Mimura et al., 2000; Takayama et al., 2003). Au final, il y aura la formation du complexe CDC45-MCM-GINS, un énorme complexe, contenant tout le matériel nécessaire pour débiter la réplication. La seule partie manquante est le signal de départ. C'est là qu'entre en jeu la kinase CDC7. Elle peut interagir avec Dbf4, formant un complexe ayant la capacité de phosphoryler l'hélicase MCM, faisant démarrer la réplication (Masai and Arai, 2002).

Même si une quantité importante de complexes de pré-répliations sont construits, ils ne sont pas tous activés au même moment. La raison de ce mécanisme reste à être élucidée mais l'idée générale est que certains de ces sites sont régulés par des facteurs externes du complexe de réplication. Par exemple, les topoisomérases peuvent modifier la structure de l'ADN environnant deux origines de réplication, favorisant l'une ou l'autre (Masai et al., 2010). Les origines de réplication sont activées en ordre chronologique afin d'éviter qu'un blocage du complexe de réplication prévienne la réplication complète de l'ADN. Certains sites qui ne sont pas normalement activés, nommées origines dormantes, peuvent devenir activés favorisant la reprise de la réplication et ainsi éviter un blocage complet menant possiblement à la mort cellulaire (Woodward et al., 2006).

Le concept du stress répliatif

Comme il a été mentionné plus tôt, la réplication de l'ADN est un processus très important pour le transfert de l'information génétique. Il est donc de la plus haute importance de garder ce mécanisme le plus fiable possible. La grande quantité d'agents exogènes ou endogènes pouvant venir compromettre l'intégrité du génome ainsi que les nombreux mécanismes développés pour les réparer démontre à quel point cela peut devenir complexe rapidement. Lors de la présence de dommages non réparés, les polymérases finiront par rencontrer ces lésions et resteront bloquées, nuisant considérablement à leur travail. Tout d'abord, les fourches de réplication, les structures formées lors de la réplication de l'ADN

(comprenant le réplisome, l'hélicase ainsi que l'ADN) deviennent plus fragiles, conséquence du fait que l'hélicase continue à dérouler l'ADN alors que le réplisome reste bloqué au niveau de la lésion (Byun et al., 2005). Un long segment d'ADN simple brin en résulte. Un complexe de protéine a été spécialement conçu pour protéger cet ADN simple brin, le complexe trimérique de réplication A (RPA) (Wold, 1997). Il joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de l'ADN et représente une partie très importante pour ce mémoire, une section ultérieure lui a donc été consacrée. Comme il a été mentionné plus tôt, cette disparité entre l'hélicase et le réplisome mène à un recrutement important de RPA sur l'ADN, cette accumulation stimule l'activation du point de contrôle via la kinase majeure de réponse aux dommages à l'ADN, ATR/Mec1 jouant un rôle important dans le maintien de l'intégrité de ces fourches compromises (Mazouzi et al., 2014). Elles permettent la mise en branle de l'arrêt cellulaire. Le concept de stress répliatif survient lorsque les cellules n'arrivent pas à réparer ces fourches de répliations bloquées ou ralenties. D'autres mécanismes de signalisation sont à l'œuvre en présence de stress répliatif. L'un d'eux est la phosphorylation du variant de l'histone 2, H2AX. Cette phosphorylation stimule la correction des lésions en favorisant le recrutement des molécules de réparation (Kuo and Yang, 2008). Cette marque, déposée sur les histones, se répand de part et d'autre de la lésion et semble être nécessaire pour le maintien du complexe de réparation impliquant des protéines telles que Nbs1, Mdc1 et 53BP1 chez l'humain (Fernandez-Capetillo et al., 2003). Chez la levure, son rôle a été principalement identifié pour la réparation des bris double brins, stimulant le recrutement du complexe Smc5/Smc6 impliqué dans la réparation par recombinaison homologue. De plus, la phosphorylation de H2AX accentue aussi l'arrêt cellulaire et prévient le recommencement immédiat de la réplication suite à la réparation des dommages (Kim et al., 2007).

La protéine de réplication A

La complexe RPA est une unité essentielle pour la reconnaissance des dommages. Il est indispensable à la survie cellulaire puisqu'il possède aussi un rôle dans la réplication de l'ADN. Ce complexe, formé de 3 sous-unités, RPA1, RPA2 et RPA3, se lie à l'ADN simple brin avec grande affinité. Durant longtemps, son rôle a été établi comme protecteur d'ADN simple brin, prévenant les dommages ainsi que les recombinaisons anormales durant la

réplication de l'ADN (Fanning et al., 2006). Cependant, ses rôles sont beaucoup plus variés. Cette protéine est engagée dans plusieurs mécanismes impliquant l'ADN dont la réplication, la réparation, et la recombinaison homologue (Heyer et al., 1990). Ses rôles sont transférables à travers presque tous les eucaryotes dont la levure. RPA peut aussi interagir avec les protéines de réparation de l'ADN, plus précisément XPA et XPG (He et al., 1995a; Lee et al., 1995). La liaison entre RPA et XPA stabilise la structure de l'ADN endommagé et favorise le recrutement des protéines de réparation (Patrick and Turchi, 2002). L'interaction avec XPG facilite la reconnaissance de son site d'excision pendant la NER (He et al., 1995). De plus, RPA possède aussi un rôle pour la réparation par recombinaison homologue via son interaction avec Rad52, un composant majeur de cette réponse (Park et al., 1996). RPA peut être phosphorylé au cours de la réplication ou suite à des dommages à l'ADN, mais le rôle exact de cette phosphorylation reste indéterminé puisque plusieurs kinases sont responsables de cette modification (Din et al., 1990). Finalement, comme il a été mentionné plus haut, RPA possède un rôle dans l'activation d'ATR/Mec1 suite à la reconnaissance de dommages à l'ADN via l'interaction avec ATRIP/DDC2. Ses rôles majeurs dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans la réplication impliquent qu'un défaut dans la régulation ou l'expression de ce complexe peut induire des problèmes considérables.

Le modèle de la levure : *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *S. cerevisiae* est un organisme unicellulaire utilisé depuis très longtemps dans les laboratoires pour faciliter la compréhension des mécanismes homologues plus complexes. La levure est un modèle de choix à cause de sa grande similitude avec les mécanismes humains au niveau des bases moléculaires de la plupart de ses mécanismes de réparation ainsi que dans l'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN. De plus, la levure possède la capacité d'être très malléable génétiquement, que ce soit pour introduire des mutations, des marquages ou même des délétions/surexpressions. La levure possède aussi une phéromone, le facteur alpha, qui permet notamment l'échange entre cellules, mais qui peut être utilisée en laboratoire pour induire un arrêt cellulaire au cours de la phase G1 (Liao and Thorner, 1980). Cet arrêt est important pour permettre l'analyse de l'efficacité de réparation aux différents points de contrôle du cycle cellulaire. Ces avantages en font aussi un modèle

extraordinaire pour étudier les effets de mutations sur les cascades de signalisation sous-jacent à la réparation des dommages induits par les UV.

Hypothèse

Le lien existant entre la régulation du cycle cellulaire et la réparation par excision de nucléotides est très mal compris. Des recherches récentes ont démontré qu'il existait un lien direct entre ces deux mécanismes strictement durant la phase S du cycle cellulaire (Auclair et al., 2008). Ces résultats suggèrent qu'une diminution de fonction d'ATR impliquerait un défaut important dans la réparation par excision de nucléotides, et ce uniquement durant la phase de réplication de l'ADN. De plus, d'autres études démontrent que des cellules affichant une diminution dans l'activité de la polymérase de translésion POLH possèderaient un défaut similaire (Auclair et al., 2010). La raison de ce défaut reste à être élucidée, mais un concept mis de l'avant est la possibilité que ces cellules mutantes aient une réponse fautive à la présence de stress réplcatif suite à une irradiation aux rayons UV.

L'hypothèse principale du projet est que des mutations conférant une augmentation du niveau de stress réplcatif induiraient un défaut dans la réponse aux dommages à l'ADN. Cette augmentation de stress réplcatif induirait une séquestration accrue de facteurs de réplication, dont le complexe RPA, au niveau des fourches de réplcations bloquées. Cette séquestration anormale causerait alors un défaut de recrutement de ce facteur (RPA) essentiel dans le processus de NER, inhibant fortement la réparation des lésions induites par les rayons UV.

Le modèle de la levure a été utilisé pour faciliter les manipulations génétiques et pour la simplicité de synchronisation aux différentes phases du cycle cellulaire. De plus, il est à noter que le mécanisme de NER est très bien conservé entre l'humain et la levure.

Objectifs

- Développer un nouvel essai permettant d'étudier la réparation par excision de nucléotide en fonction du cycle cellulaire chez la levure
- Déterminer si Mec1, l'homologue d'ATR, est aussi requis pour la réparation par excision de nucléotides spécifiquement durant la phase S chez la levure
- Investiguer le défaut de NER observé et déterminer le ou les mécanismes sous-jacents pouvant expliquer ce défaut

Matériel et Méthodes

Culture cellulaire

Les cellules utilisées dans cette études proviennent de la collection BY4741 haploïde MAT a *yeast knockout collection* de ThermoScientific : YSC1053. De plus, certaines souches W303 ont été utilisées, leur génotype a été indiqué dans l'annexe 2. Les plasmides d'expression RAD26 et RAD26 S27A ont été obtenus du laboratoire du Dr J.Q Svejstrup. Pour synchroniser les cellules dans les différentes phases du cycle cellulaires plusieurs produits ont été utilisés. Les cultures ont été diluées pour la nuit 25°C afin d'obtenir des concentrations de 0.5 OD / ml en phase exponentielles. Elles ont par la suite été incubées à 30°C pour la durée des expériences. Pour la synchronisation en G1, les cellules ont été diluées une deuxième fois à 0.1875 OD/ml et arrêtées en utilisant du facteur alpha 5 ug/ml pour 1h30 à 30°C. Une deuxième dose de facteur alpha 5 ug/ml a été ajoutée pour un autre 1h15 à 30°C. Après synchronisation en phase G1, il était possible de poursuivre avec une synchronisation en phase S ou G2/M. Pour la synchronisation en phase S, les cellules étaient lavées et le facteur alpha était retiré. Les cellules étaient alors resuspendues dans 50 ug/ml de pronase. Pour la synchronisation en phase G2/M, les cellules étaient resuspendues dans un milieu contenant aussi 15 ug/ml de nocodazole (Cedarlane, 1% DMSO concentration finale) pour 3h à 30°C. Les agents génotoxiques utilisés, ont été acheté chez Sigma-Aldrich pour le méthylméthane sulfonate et l'acide indole-3-acétique et Bioshop Canada pour l'hydroxyurée et l'oxyde 4-Nitroquinoline.

Irradiation aux rayons UV

Une lampe UV germicide monochromatique 254-nm G25T8 (Philips) a été utilisée pour irradier les cellules à un taux de $1\text{J}/\text{m}^2/\text{s}$ mesuré à l'aide d'un radiomètre digital Spectroline DRC 100x équipé d'un senseur DIX-254. Les cellules ont été lavées à l'eau pour enlever le milieu de culture puis déposées dans un petit contenant de plastique pour ne recouvrir que le fond. Elles ont été irradiées à une densité de 0.5 OD/ml. Les cellules étant utilisées sur plat de pétri ont été irradiées immédiatement après avoir été déposées. Les

irradiations et les expérimentations post-irradiation ont été conduites dans le noir pour prévenir l'activité de la photolyase.

Détection par immunoblots de type western

Des lysats cellulaires complets ont été préparés à partir d'une lyse cellulaire alcaline ou par précipitation à l'aide d'acide trichloroacétique et de billes de verre. Les lysats ont été ensuite préparés pour électrophorèse SDS-PAGE et transférés en utilisant des protocoles standards de biologie moléculaire. Les anticorps utilisés pour la détection sont : souris monoclonal 12CA5 anti-HA et anti-Flag M2 (Sigma-Aldrich); rat anti-Tubulin (Abcam; ab6161). La détection immunohistochimique a été effectuée à l'aide du système d'images LAS-3000 (FUJI) et la quantification des signaux a été effectuée avec le programme ImageQuant v5.2 de GE Healthcare.

Quantification du contenu en ADN par cytométrie en flux

L'ADN a été marqué en utilisant du Sytox Green (Invitrogen) en utilisant une technique déjà bien caractérisée (Haase and Reed, 2002). L'analyse par cytométrie en flux a été performée sur le FACS Calibur (Becton-Dickinson, Mississauga, Canada) et les résultats analysés à l'aide du programme FlowJo 7.6.5 (FlowJo, LLC).

Quantification de l'élimination des CPD par cytométrie en flux

Après avoir collecté 0.5 OD de cellules, celles-ci ont été fixées dans de l'éthanol 95% à 4°C pour la nuit. Elles ont par la suite été lavées avec 2 ml de PBS et incubées avec 20 ug/ml Zymolyase T20 (Bioshop Canada) dilué dans du PBS à 30°C pour 40 minutes. Elles ont ensuite été incubées dans 1 ml 0.2N HCl à température ambiante pour 15 minutes suivit d'une neutralisation avec 3 ml de Borax pH9 0.1M. Les cellules ont été lavées avec du PBS et incubées dans 1 ml PBS contenant 0.5 mg/ml RNase A (Bioshop Canada) pour 1h à 37°C. Subséquemment, les cellules ont été lavées avec 3ml de PBS-TB (PBS, 1% BSA, 0.25% Tween-20) et incubées dans 0.35 ml PBS-TB contenant une dilution 1/1000 de l'anticorps de souris anti-CPD (Kamiya Biomedical, MC-062) pour une durée de 1h30 à température ambiante. Après un lavage au PBS-TB, les cellules ont été resuspendues dans 0.35 ml de PSB-

TB contenant une dilution 1/300 de l'anticorps secondaire conjugué de chèvre Alexa647 (Invitrogen, A21235) pendant 1h dans le noir à température ambiante. Finalement, les cellules ont été lavées avec du PSB-TB et resuspendues dans 1 ml de PBS contenant 1 ug/ml Sytox Green (Invitrogen) puis analysées par cytométrie en flux en utilisant le cytomètre FACS Calibur (Becton-Dickinson, Mississauga, Canada). Les données ont été analysées à l'aide du programme FlowJo 7.6.5 (FlowJo, LLC)

Quantification de l'élimination des CPD par slotblot

L'ADN génomique des cellules a été obtenu en utilisant les procédures développées précédemment d'extraction au phénol-chloroforme. L'ADN a été marqué en utilisant le pico-green (Invitrogen) et sa concentration a été mesurée à l'aide d'un fluoromètre TBS-380 (Turner Biosystems). Une concentration de 100 ng d'ADN a été liée à une membrane Zeta-Probe (BioRad) en utilisant le module Bio-Dot SF (BioRad). Les membranes ont été incubées avec l'anticorps de souris anti-CPD (Kamiya Biomedical, MC-062). La détection immunohistochimique a été effectuée à l'aide du système d'images LAS-3000 (FUJI) et la quantification des signaux a été effectuée avec le programme ImageQuant v5.2 de GE Healthcare.

Analyse par microscopie à fluorescence

Les cellules ont été fixées à l'aide de formaldéhyde comme décrit précédemment (Wurtele et al., 2012). Les images ont été obtenues grâce au microscope DeltaVision Elite System (GE Healthcare) équipé d'un optique UIS2 60x/1.42, Plan Apo, d'une caméra 15-bit EDGE/sCMOS (PCO) et du programme SoftWoRx v6.2.0. Au minimum 200 cellules ont été sélectionnées par échantillons. Les images ont été analysées avec le programme Image J 1.46E (NIH).

Résultats

Développement d'un essai de quantification du NER

Considérant le modèle utilisé de *S.cerevisiae*, il était crucial de déterminer si les cellules de levures se comportaient de la même manière que les cellules humaines; il fallait déterminer si le défaut de NER observé spécifiquement en phase S chez les cellules humaines déficientes en ATR ou en POLH pouvait être observé chez *S.cerevisiae*. Pour ce faire, il a été nécessaire d'adapter l'essai de quantification de NER qui avait été développé pour l'humain à la levure. Le mutant *rad4Δ* a été utilisé comme contrôle négatif. Comme il a été mentionné plus haut, la protéine Rad4 est essentielle au processus de NER, une délétion inhibe complètement la réparation des CPD. En synchronisant les cellules en phase G2/M avec du nocodazole et en les maintenant dans cette phase, il serait possible de les irradier et de mesurer l'efficacité de NER. Suite à une irradiation avec 100J/m^2 UV, les cellules développeraient une quantité de lésions équivalente à 100% des CPD. Une cellule qui possède une NER normale réparerait adéquatement les CPD alors que les cellules portant la mutation *rad4Δ* ne réparerait pas ces lésions. On observerait donc une diminution du signal des CPD à travers le temps pour la cellule qui répare, mais un maintien pour celle qui ne répare pas. En quantifiant l'ADN par cytométrie en flux à l'aide de Sytox Green, il est possible d'identifier dans quelles phases du cycle cellulaire la majorité des cellules sont. Les cellules en phase G1 auront une copie de chacun des chromosomes (équivalent à 1n chromosome), les cellules en phase G2 auront deux copies (ou 2n) alors que les cellules en phase S auront entre 1n et 2n la quantité d'ADN. Il est possible de voir que la synchronisation est semblable entre les deux souches, la plupart des cellules se retrouvant avec 2n la quantité d'ADN, donc en phase G2. De plus, les cellules sont bien maintenues dans cette phase même 90 minutes après irradiation UV grâce à la présence de nocodazole (Figure 7A). Le contenu en CPD étant marqué de l'anticorps anti-CPD fluorescent, il est possible de mesurer l'intensité de fluorescence à différents points à travers la durée de l'expérience. Les niveaux basaux de fluorescence pour les deux souches sont similaires (no UV). Suite à l'irradiation aux UV, l'augmentation de signal, reflétant une augmentation dans la quantité de CPD, est semblable (Figure 7B). Au fil de l'expérience, l'intensité du signal pour la souche sauvage (WT) diminue pour revenir

presqu'au niveau basal après 90 minutes. En comparaison, les niveaux de la souche mutante *rad4Δ* restent presque identiques tout au long de l'expérience, représentant un maintien des niveaux de CPD, et donc un manque de réparation (Figure 7B). Pour mieux illustrer ce résultat, il est possible d'utiliser la moyenne géométrique de chaque signal de fluorescence et de porter ce résultat en graphique. Le pourcentage de CPD restant est utilisé comme axe vertical et le temps comme axe horizontal. À 0 minute, c'est-à-dire tout de suite après irradiation, 100% des CPD sont présents, et plus l'expérience progresse, moins le signal de CPD est important pour la souche sauvage (WT) pour finalement arriver à moins de 5% de CPD restant après 90 minutes. Le mutant *rad4Δ* ne répare presque pas tout au long de l'expérience et son signal reste près de 100% tout au long de l'expérience (Figure 7C). Pour appuyer la robustesse de ce nouvel essai, une expérience complémentaire de *slotblot* a été effectuée en utilisant les mêmes échantillons (Figure 7D gauche). En quantifiant les bandes obtenues par immunohistochimie puis en portant en graphique de pourcentage de CPD restant, il est possible d'observer des résultats presque identiques (Figure 7D droit). Ces résultats confirment que l'essai par cytométrie en flux développé peut mesurer efficacement et précisément des variations dans les niveaux de CPD d'une population de cellules et ainsi mesurer indirectement l'efficacité du NER.

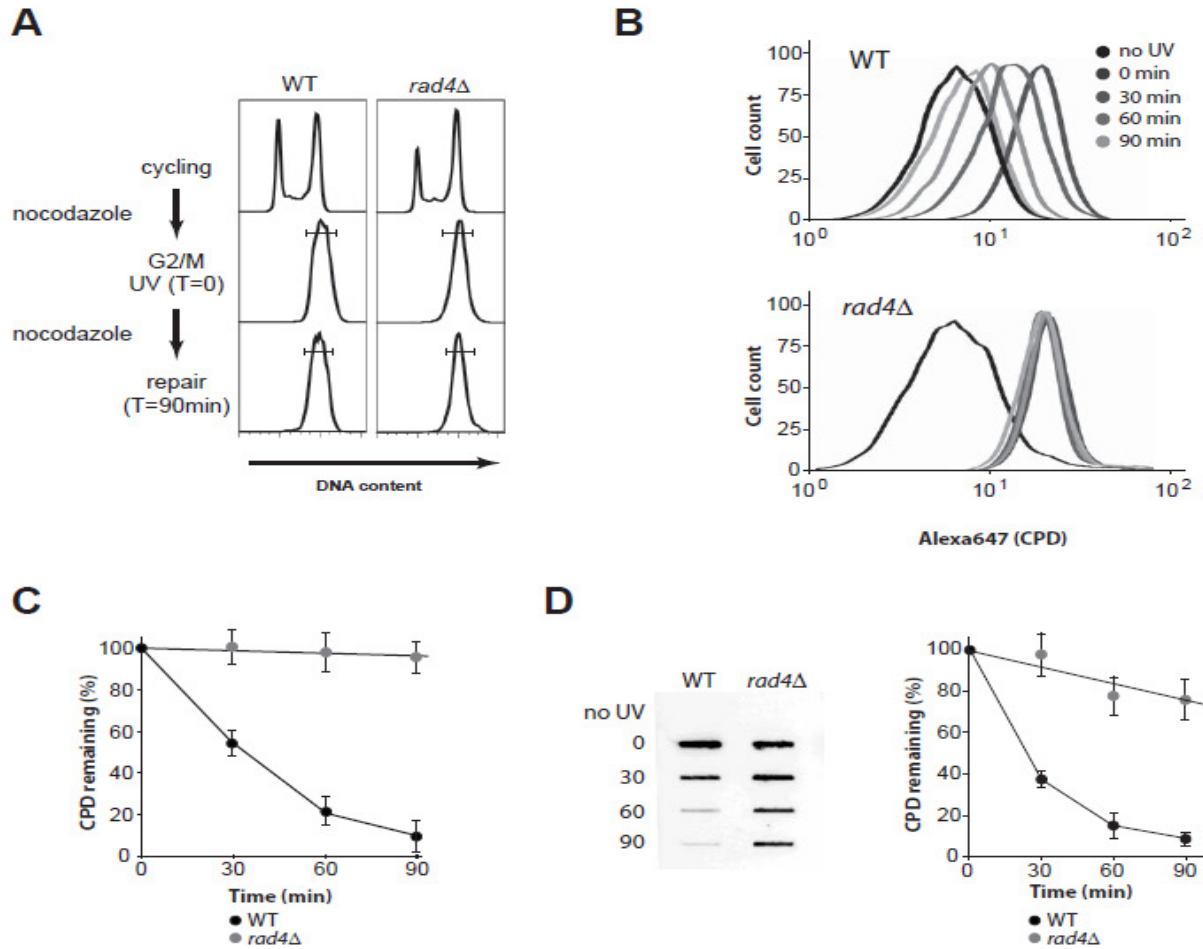


Figure 7. Quantification de l'élimination des CPD par cytométrie en flux.

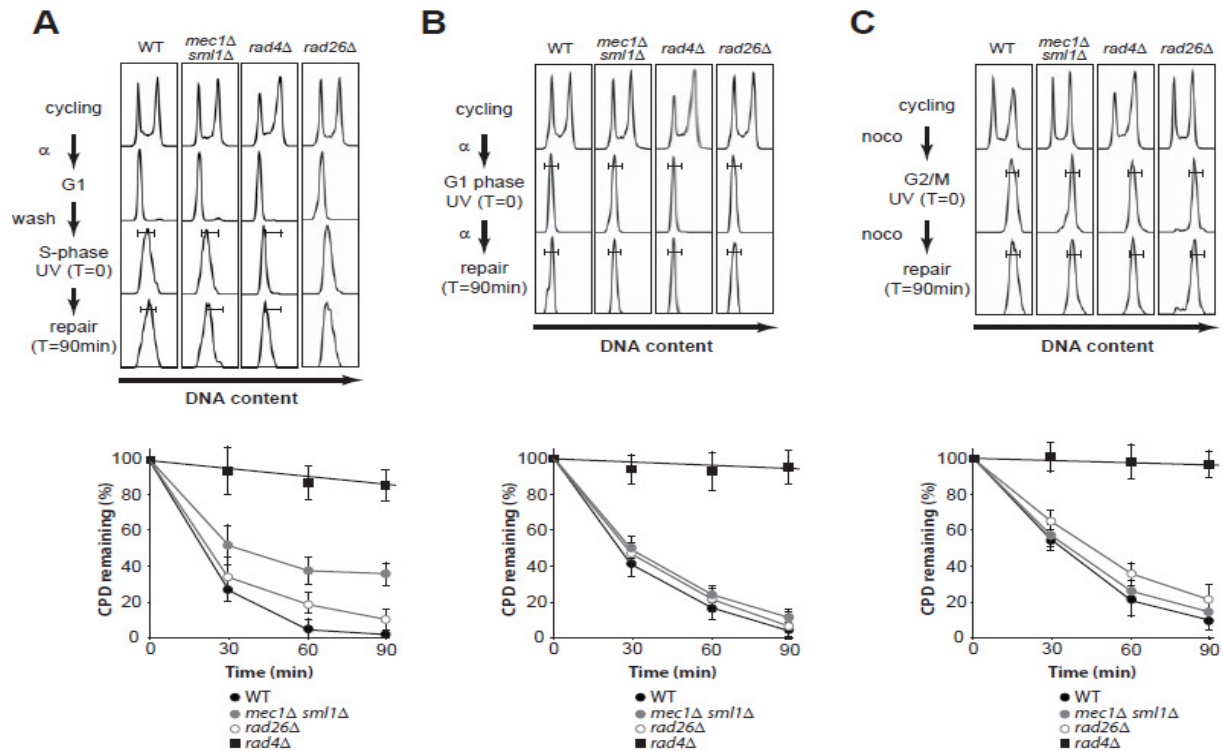
A. Synchronisation et maintien de cellules BY4743 WT et *rad4Δ* en phase G2 en utilisant du nocodazole. Les cellules ont été irradiées avec 100J/m^2 UV ou non irradiée et incubées pour 90 minutes. Les histogrammes représentent les différents profils de quantité d'ADN suite au marquage de cet ADN avec le Sytox Green. **B.** Les cellules ont été collectées à différents points après irradiation UV, fixées et marquées avec l'anticorps fluorescent anti-CPD (Alexa647). Les histogrammes montrent le signal de fluorescence de l'anticorps Alexa647 à différents points après irradiation pour la souche WT et mutante *rad4Δ*. **C.** La moyenne géométrique du signal de l'anticorps Alexa647 a été utilisée pour calculer le pourcentage de CPD restant par rapport au signal initial. **D.** Les mêmes cellules ont été lysées et 100 ng d'ADN génomique ont été analysé par slot-blot en utilisant un anticorps anti-CPD (gauche). Les bandes ont été quantifiées par densitométrie et le pourcentage de CPD restant par rapport au signal initial a été calculé (droit).

Le mutant *mec1Δ sml1Δ* possède un défaut de NER spécifiquement durant la phase S

Après avoir développé l'essai de quantification des CPD, la première question était de déterminer si le défaut de NER observé spécifiquement durant la phase S chez l'humain pouvait être récapitulé chez la levure. Pour ce faire, il a été important de synchroniser les cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, soit G1, S et G2 respectivement. Les mutants *mec1Δ sml1Δ*, *rad4Δ* et *rad26Δ* ont été utilisés. Mec1 étant la protéine homologue d'ATR et Rad26 étant un des effecteurs de Mec1 impliqué dans le TC-NER chez la levure. Il est important d'utiliser le double mutant *mec1Δ sml1Δ*, puisque le simple mutant *mec1Δ* n'est pas viable. La protéine Sml1 doit être éliminée lors de la phase S de façon Mec1-dépendante et Rad53-dépendant et l'incapacité de l'éliminer résulte en une mort cellulaire (Zhao et al., 2001). Le mutant *rad4Δ* a encore une fois été utilisé comme contrôle négatif de réparation. Pour la première expérience, les cellules ont été synchronisées en phase S. Afin de s'assurer que toutes les cellules étaient synchronisées au même moment au cours de la phase S, une synchronisation préalable en G1 a été effectuée en utilisant du facteur alpha. Elles ont par la suite été relâchées simultanément dans la phase S, puis irradiées avec 100 J/m² UV. Différents échantillons ont été collectés à des temps allant de 0 jusqu'à 90 minutes. La quantité en ADN a été mesurée par cytométrie en flux pour s'assurer que les cellules étaient bien synchronisées. Les cellules sont bel et bien au milieu de la phase S puisqu'elles ont un contenu en ADN étant supérieur à une fois, mais inférieur à 2 fois. Ce profil est similaire pour les 4 souches utilisées (Figure 8A haut). Par la suite, l'intensité de fluorescence de l'anticorps anti-CPD Alexa647 a été mesurée de la même manière que décrit plus haut. Le pourcentage de CPD restant par rapport au signal initial a été calculé puis porté en graphique en fonction du temps. Il est possible d'observer une diminution significative de la quantité de CPD pour la souche sauvage après 90 minutes ainsi qu'une grande quantité de CPD restants pour le mutant *rad4Δ*, similaire à ce qui a été observé dans l'expérience précédente. De plus, il est possible de voir que le mutant *mec1Δ sml1Δ* se situe dans un état intermédiaire entre la souche sauvage, qui répare normalement, et le mutant *rad4Δ*, qui ne répare pas (Figure 8A bas). Ce résultat suggère que le mutant *mec1Δ sml1Δ* élimine plus lentement les CPD qu'une souche normale sauvage, suggérant une déficience dans la réparation par NER durant la phase S. Pour ce qui est du

mutant *rad26Δ*, il semble moins affecté que le mutant *mec1Δ sml1Δ* puisque sa réparation est plus rapide, mais un léger défaut est observable. Ce résultat suggère que la protéine Rad26 pourrait être un facteur important pour expliquer le défaut de NER, mais qu'il ne représente pas la seule raison à ce problème. À partir de là, il fallait déterminer si cet effet était spécifique à la phase S. Il a donc fallu reproduire la même expérience, mais cette fois en synchronisant les cellules dans la phase G1 avec du facteur alpha ou dans la phase G2 avec du nocodazole. Le contenu en ADN a été utilisé encore une fois pour s'assurer de la synchronisation adéquate pour la phase G1 (Figure 8B haut), et la phase G2 (Figure 8C haut). L'intensité de fluorescence de l'anticorps anti-CPD a été mesurée pour les deux conditions puis portée en graphique (Figure 8B bas) et aucun effet significatif n'a été détecté dans l'élimination des CPD que ce soit pour la souche *mec1Δ sml1Δ* ou *rad26Δ*. En concordance avec les résultats précédemment démontré chez l'humain, Mec1 semble bien requis pour une réparation efficace des CPD spécifiquement en phase S chez la levure. Par la suite, d'autres expériences ont été effectuées pour déterminer si d'autres effecteurs de Mec1 pouvaient expliquer le défaut. La protéine Rad53 a été ciblée puisqu'elle est directement liée à Mec1 dans cette voie de signalisation. Comme il a été mentionné plus haut, la protéine Rad53 est nécessaire pour l'élimination de Sml1 durant la phase S, il a donc été nécessaire de produire un double mutant *rad53Δ sml1Δ*. Des cellules sauvages ainsi que des cellules *rad53Δ sml1Δ* ont été synchronisées en phase S en utilisant du facteur alpha, puis relâchées simultanément en phase S, irradiées et collectées. Le contenu en ADN a été quantifié pour s'assurer de la synchronie (Figure 8D gauche) et l'intensité de fluorescence mesurée avec l'anticorps Alexa647. Le résultat démontre une situation similaire à celle observée pour *mec1Δ sml1Δ*, c'est-à-dire que le mutant *rad53Δ sml1Δ* élimine les CPD de manière plus lente qu'une souche sauvage ce qui suggère un défaut de NER (Figure 8D droit). Pour s'assurer que cet effet était bien spécifique à la phase S, les cellules ont aussi été synchronisées en phase G2 avec nocodazole et aucun défaut n'a été observé pour le mutant *rad53Δ sml1Δ* (Figure 8E). Considérant que les deux souche ne possédaient pas la protéine Sml1, il se pouvait que les résultats obtenus soient causés par cette délétion. Pour investiguer cette hypothèse, il a été possible d'utiliser un inhibiteur connu des phosphoinositide 3-kinase (PI3K), dont Mec1 fait partie, la caféine. Cet inhibiteur simulerait une déficience en Mec1. Cette technique n'est pas optimale puisque la caféine affecte toutes les PI3K, il se pouvait donc que l'effet observé soit dû à un effet indirect

d'une inhibition d'une autre PI3K. Pour palier à ce problème, il a suffi de traiter la souche *mec1Δ sml1Δ* de la même manière. De cette façon, si un effet cumulatif avait été observé, il aurait été facile de le détecter puisqu'il y aurait eu une réparation encore moins efficace des CPD. Les cellules ont été synchronisées en phase S et incubées avec 0.5% caféine et irradiées aux UV. La caféine a été maintenue tout au long de l'expérience pour simuler pleinement le mutant *mec1Δ sml1Δ*. Ensuite, l'intensité de fluorescence a été mesurée. Deux résultats ont été obtenus. Le premier étant que l'inhibition de Mec1 par la caféine induit un défaut de NER en phase S dans une souche sauvage similaire à l'effet d'une délétion *mec1Δ sml1Δ* et que cette inhibition n'amplifiait pas l'effet déjà présent causé par cette délétion (Figure 8F).



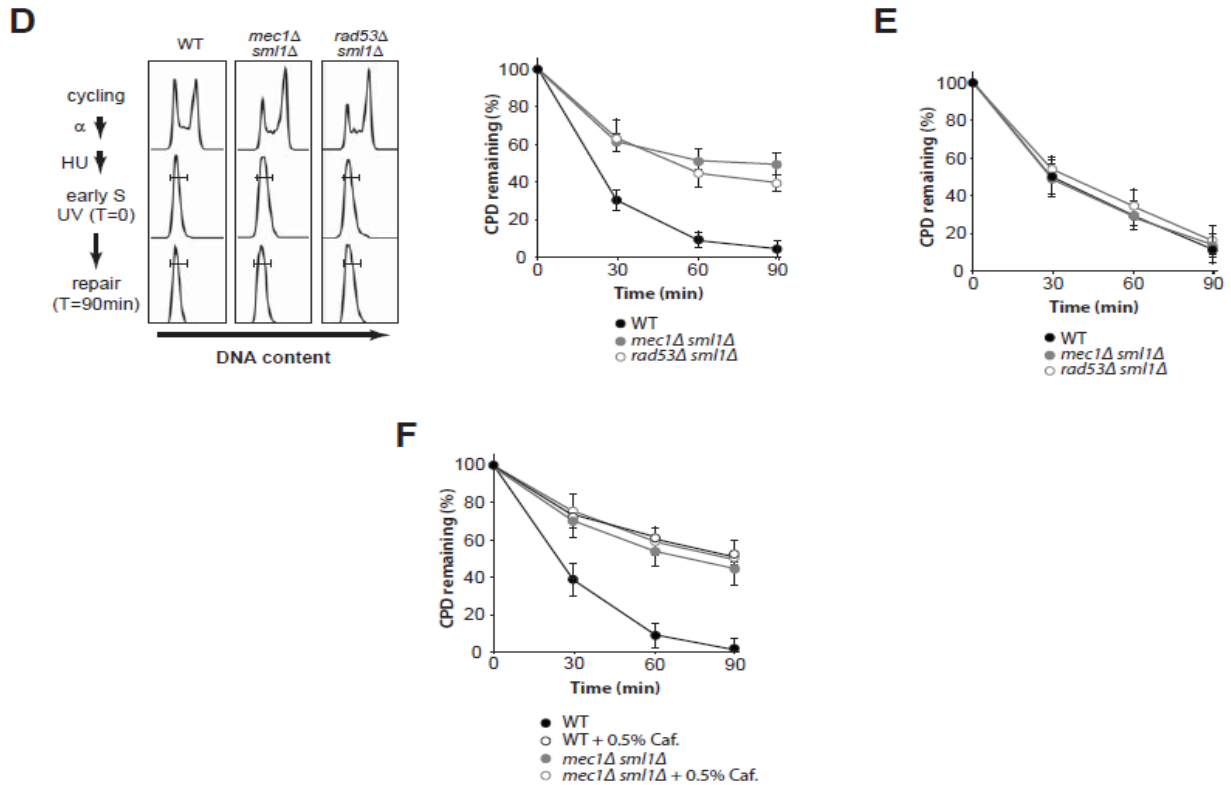


Figure 8. Le mutant *mec1Δ sml1Δ* possède un défaut de NER spécifique à la phase S.

A. Des cellules BY4743 WT, *mec1Δ sml1Δ*, *rad26Δ* et *rad4Δ* ont été synchronisées en phase G1 avec 5 ug/ml facteur alpha puis relâchées 30 minutes en phase S avec pronase. Les cellules ont été irradiées avec 100 J/m² UV ou non irradiées et collectées à différents points post-UV. Les histogrammes représentent les différents profils de quantité d'ADN suite au marquage de l'ADN avec le Sytox Green (haut). La quantité de CPD a été mesurée avec l'anticorps fluorescent anti-CPD Alexa647 puis la moyenne géométrique a été portée en graphique en pourcentage de CPD par rapport au signal initial (bas). **B.** Même expérience qu'en A, mais les cellules ont été synchronisées en phase G1 et maintenue en G1 avec le facteur alpha 5 ug/ml. **C.** Même expérience qu'en A, mais les cellules ont été synchronisées en phase G2 à l'aide du nocodazole. **D.** Synchronisation de cellules W303 WT, *mec1Δ sml1Δ* et *rad53Δ sml1Δ* en phase S à l'aide de 5 ug/ml de facteur alpha. Les cellules ont été marquées au Sytox Green et portées en histogramme de profils d'ADN (gauche) et les CPD ont été quantifiés et la moyenne géométrique a été utilisée pour porter en graphique le pourcentage de CPD restant par rapport à la quantité initiale (droit). **E.** Même expérience qu'en D, mais les cellules ont été synchronisées en phase G2 avec du nocodazole. **F.** Des cellules WT et *mec1Δ sml1Δ* ont été synchronisées en phase G1 avec du facteur alpha 5 ug/ml puis relâchées en phase. De la caféine a été ajoutée ou non au milieu à concentration de 0.5%, et ce 30 minutes avant l'irradiation. La quantité de CPD a été mesurée, la moyenne géométrique a été utilisée et portée en graphique de pourcentage de CPD restant par rapport au signal initial.

Le défaut de NER observé en phase S dépend de l'initiation de la réplication

Puisque l'effet observé était unique à la phase S, la question suivante était de savoir si cet effet avait un lien avec la réplication de l'ADN, qui se déroule aussi exclusivement durant la phase S. Pour tester l'hypothèse d'un lien possible entre la réplication de l'ADN et ce défaut de NER, il a suffi de mesurer la réparation des CPD dans deux souches, l'une initiant la réplication, l'autre non. Chez la levure, il existe un mutant *cdc7^{ts}* qui est sensible à la température (Donaldson et al., 1998). À température ambiante (25°C), la protéine est activée normalement, cependant à température plus élevée (37°C), cette protéine est inactivée et ne permet pas l'initiation de la réplication. La température d'incubation idéale pour faire croître des levures se situant entre 25°C et 35°C, cette élévation de température n'aura presque pas d'impact sur sa progression cellulaire autre que via l'inactivation de CDC7 (Donaldson et al., 1998). Cette mutation a donc été introduite dans une souche sauvage ainsi qu'une souche *mec1Δ sml1Δ*. Par la suite, les cellules ont été synchronisées en phase G1 avec facteur alpha et relâchées en phase S, soit à 25°C, température permissive, ou 37°C, température inhibitrice, puis irradiées avec 100J/m² UV. Les histogrammes de profils d'ADN ont été conçus grâce à la mesure du contenu en ADN marqué au Sytox Green (Figure 9 gauche). De plus, l'élimination des CPD a été mesurée à l'aide de l'anticorps anti-CPD Alexa647 dans les deux conditions et les résultats montrent que lorsque l'initiation de la réplication est inhibée (à 37°C), aucun défaut de réparation est observable alors que, lorsque celle-ci est activée (à 25°C), un défaut de réparation similaire à celui observé dans les conditions expérimentales précédentes est observé. Ces résultats démontrent que l'initiation de la réplication est nécessaire pour induire un défaut de NER durant la phase S. Ces observations suggèrent que le défaut de NER n'est pas lié directement à l'activation des CDK lors du passage à travers le cycle cellulaire, mais plus spécifiquement à l'entrée en phase S. Ce résultat pourrait donner un indice sur les raisons expliquant pourquoi le défaut n'est pas observé dans les phases G1 et G2 du cycle cellulaire puisque dans ces phases aucune réplication d'ADN est présente.

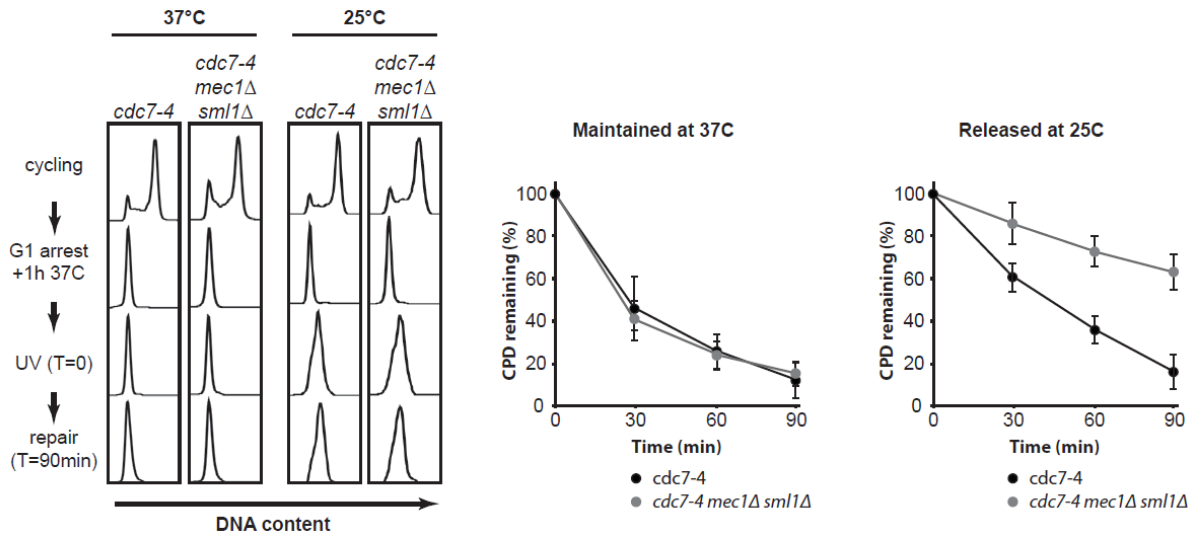


Figure 9. Le défaut de NER en phase S dépend de l'initiation de la réplication. L'élimination des CPD a été mesuré dans des souches *cdc7-4* thermosensibles avec ou sans les délétions de Mec1 Sml1. Les cellules ont été synchronisées en phase G1 à l'aide de facteur alpha 5 ug/ml puis relâchés en phase S à 25°C ou 37°C. À la température permissive de 25°C, la réplication est initiée alors qu'à 37°C, les complexes ne sont pas formés et la réplication n'est pas initiée.

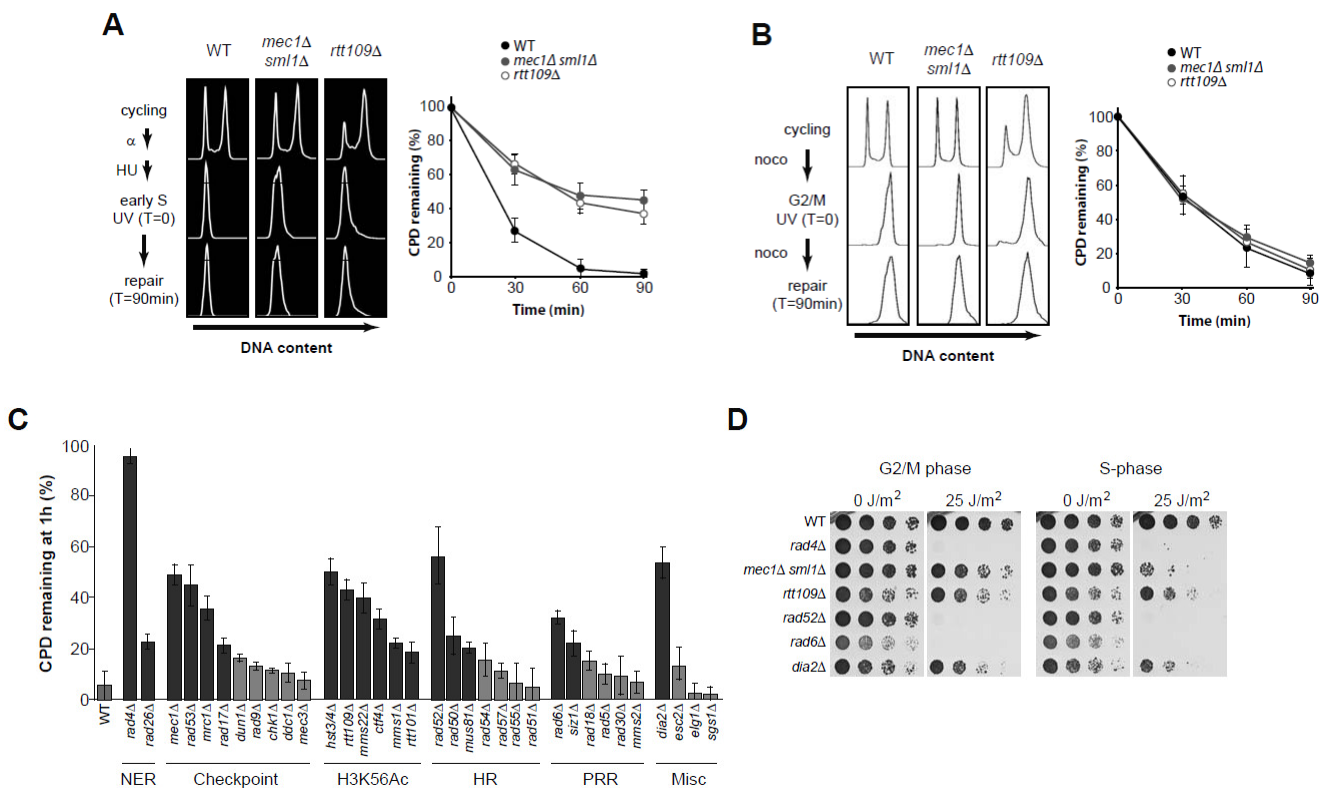
Plusieurs mutants possédant du stress réplcatif ont un défaut de NER en phase S

Le défaut de NER étant lié à la réplication de l'ADN, il se pouvait que ce soit un problème lié à la réplication elle-même qui cause le défaut de NER. Le mutant *mec1Δ sml1Δ* ainsi que le mutant *rad53Δ sml1Δ* sont tous deux reconnus comme ayant du stress réplcatif spontané (Alvaro et al., 2007). L'hypothèse à cette étape était que le stress réplcatif pouvait peut-être être la cause du défaut de NER. À partir de cela, la première étape était de prouver ce concept en utilisant un mutant reconnu comme ayant du stress réplcatif, mais ne présentant pas de rôle direct avec le NER. Un premier mutant a été sélectionné, le mutant *rtt109Δ*. Cette protéine est une histone acétyl transférase importante dans la survie cellulaire après dommages à l'ADN, mais elle n'est pas reconnue pour être impliquée directement dans le NER. La première étape était de synchroniser les cellules en phase S et irradier aux UV, de la même manière que précédemment, pour ensuite mesurer l'efficacité d'élimination des CPD. En concordance avec notre hypothèse, le mutant *rtt109Δ* démontrait un défaut de réparation en phase S (Figure 10A), mais pas en phase G2 (Figure 10B). Cette découverte laissait présager

que d'autres mutants exprimant du stress répliatif pouvaient aussi être déficient en NER spécifiquement durant la phase S. Le mutant *rtt109Δ* étant un très bon candidat, car cette protéine est impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN via son rôle dans l'acétylation de l'histone H3 sur sa lysine 56, mais ne possédait pas de rôle direct avec le NER (Han et al., 2007). Cette marque épigénétique est importante et en son absence, une sensibilité accrue aux dommages à l'ADN est observable (Schneider et al., 2006). Il était important de vérifier si d'autres protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN démontraient un défaut similaire. Une banque d'environ 30 mutants a été sélectionnée. Chaque protéine se classait sous une parmi 6 classes, soit des protéines du NER, des protéines du point de contrôle, des protéines de remodelage de l'ADN, des protéines de la recombinaison homologue, des protéines de la réponse post-réplication ou finalement des protéines n'entrant dans aucune de ces classes. Chaque souche mutante a été synchronisée en phase S, irradiée, puis traitée de façon identique aux expériences précédentes. Cependant, contrairement aux expériences précédentes, uniquement trois échantillons ont été collectés, un avant irradiation, pour déterminer la valeur de base de fluorescence, un directement après irradiation, marquant la quantité de CPD produits, puis un 90 minutes après irradiation pour voir la quantité de CPD éliminé. Le pourcentage de CPD restant par rapport à la quantité initiale a été calculée pour chacune des souches mutantes et portée en histogramme à des fins de comparaison (Figure 10C). Les résultats démontrent que plus de 20 des mutants qui ont été reconnus pour avoir du stress répliatif ont aussi un défaut de NER durant la phase S. Il a été nécessaire de pousser plus loin les expériences et de déterminer si ce défaut était spécifique à la phase S. Pour ce faire, le mutant affichant le défaut le plus important dans chacune des classes a été sélectionné, soit les mutants *rad52Δ*, *rad6Δ* et *dia2Δ*, en plus des mutants déjà utilisés, *mec1Δ* *sml1Δ* et *rtt109Δ*. Chacune des protéines étudiées porte un rôle dans une voie différente. Rtt109 est impliqué dans l'assemblage de la chromatine, Rad6 dans la réparation post-réplication, Rad52 dans la recombinaison homologue et Dia2 dans le désassemblage du réplisome (Park et al., 1996; de Padula et al., 2004; Han et al., 2007; Koepp et al., 2006). Une expérience préliminaire a été effectuée pour voir si ces souches étaient plus sensibles à une irradiation en phase S qu'à travers les autres phases du cycle. Pour ce faire, des cellules de chacun des mutants ont été synchronisées en phase G2 avec nocodazole ou encore en phase S avec hydroxyurée puis diluées en série et finalement déposées sur plaque d'agar contenant un milieu

de culture riche, YPD. Les colonies ont ensuite été irradiées ou non aux UV. Suite à cette irradiation, les cellules sont incubées pendant quelques jours et comparées. Selon ces résultats, les mutants *rad52Δ* et *rad6Δ* sont extrêmement sensibles aux UV, même synchronisés en phase G2, puisqu'aucune cellule n'est détectée. Les mutants *rtt109Δ*, *mec1Δ sml1Δ* et *dia2Δ* sont plus sensibles que la souche WT, mais réussissent quand même à survivre (Figure 10D gauche). Lors de l'analyse de la plaque possédant des cellules synchronisées en phase S, le même schéma est représenté pour les mutants *rad52Δ* et *rad6Δ* qui perdent toute viabilité. Par contre, une légère différence apparaît entre la plaque synchronisée en phase G2 et celle synchronisée en phase S. Les mutants *mec1Δ sml1Δ*, *rtt109Δ* et *dia2Δ* apparaissent avec moins de dilution ce qui signifie que moins de cellules ont survécu au traitement (Figure 10D droit), ces mutants sont donc plus sensibles à l'irradiation aux UV lorsqu'ils sont irradiés en phase S que lorsqu'ils sont irradiés durant la phase G2. Suite à cette expérience préliminaire, il fallait déterminer si c'était le passage à travers la phase S qui induisait un défaut ou simplement le fait que la cellule se situe dans l'étape de réplication de l'ADN. Pour ce faire, des cellules ont été synchronisées en phase G1 et séparées selon 4 conditions puis irradiées. La première condition consistait à les maintenir en phase G1 et mesurer leur efficacité de réparation de CPD. La deuxième condition consistait à irradier les cellules maintenues en début de phase S et ensuite mesurer l'élimination des CPD. Les troisième et quatrième conditions sont produites au cours de la même expérience qui consistait à relâcher les cellules à travers la phase S et mesurer l'efficacité de NER au tout début de la phase G2 suivant la complétion de la phase S (2h après le relâchement) ou bien après avoir terminé la phase S (4h après relâchement) (Figure 10E gauche). Cette expérience a été réalisée pour déterminer si le passage à travers la phase S était nécessaire pour induire un défaut de NER. La condition 1 simule une situation où il n'y a pas de réplication, aucun des mutants n'affiche de défaut de NER (Figure 10E droit, G1). Lorsque les cellules sont synchronisées en phase S et maintenues en phase S, la souche WT n'affiche toujours pas de défaut, cependant tous les mutants développent un défaut d'élimination des CPD, similaire aux résultats obtenus précédemment (Figure 10E droit, S). Les résultats plus intéressants arrivent par la suite. Lorsque les cellules sont synchronisées et relâchées à travers la phase S pendant assez longtemps pour qu'elles soient considérées comme en début de phase G2, elles affichent un défaut même en phase G2 (Figure 10E droit, 2h). Par contre, 4h après le relâchement à travers la phase S, quelques heures après que la

phase S soit terminée, le défaut de NER n'est plus présent (Figure 10E droit, 4h). Ce résultat inattendu suggère qu'il est nécessaire de traverser la phase S pour induire un défaut de NER. L'idée suivante était qu'il se pouvait que des facteurs importants pour le NER et la réplication de l'ADN soit séquestrés aux fourches de réplication endommagées et qu'il serait alors impossible d'effectuer la réparation efficacement par manque de ces facteurs de réparation.



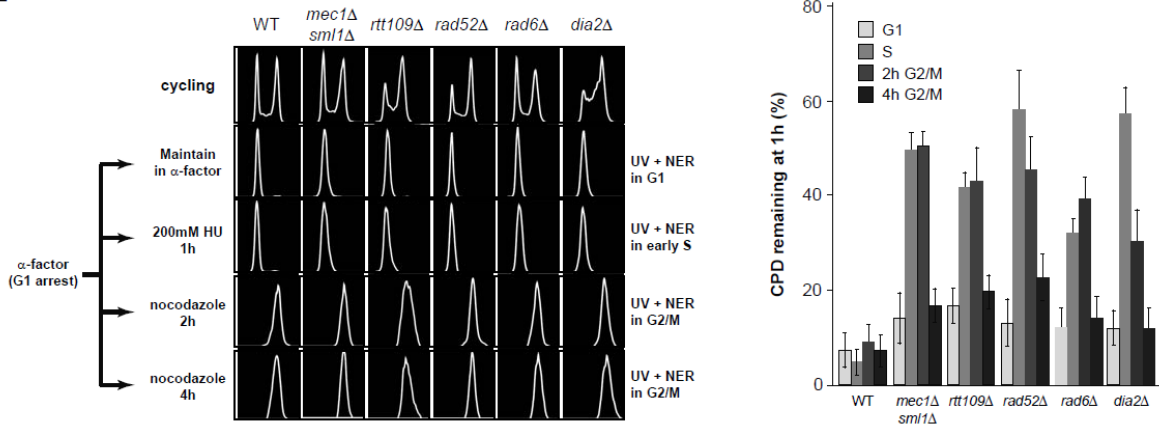
E

Figure 10. Une variété de mutants sensibles au stress réplcatif possèdent un défaut de NER spécifiquement en phase S. **A.** Quantification de l'élimination des CPD dans les souches WT, *mec1Δ sml1Δ* et *rtt109Δ* suite à une synchronisation en phase G1 à l'aide de 5 ug/ml de facteur alpha puis relâchés en phase S. **B.** Quantification de l'élimination des CPD dans les mêmes souches, mais synchronisées en phase G2 à l'aide de nocodazole. **C.** Quantification de l'élimination des CPD en phase S comme en A pour une vaste série de mutants reconnus comme ayant du stress réplcatif. Les souches possédant un défaut significatif ($P < 0.01$, t-test) sont indiquées en gris foncé alors que celles avec un défaut non significatif sont marquées en gris pâle. **D.** Les mutants qui possèdent un défaut significatif dans l'élimination des CPD possèdent aussi une survie réduite en présence d'UV. Les cellules ont été préalablement synchronisées en phase S avec facteur alpha 5 ug/ml ou en phase G2 avec nocodazole. Elles ont ensuite été diluées en série et déposées sur plaques un milieu riche d'agar-YPD. Les plaques ont finalement été irradiées ou non irradiées avec 100J/m^2 UV. Les souches WT et *rad4Δ* sont utilisées comme contrôles. **E.** Les cellules ont été synchronisées en phase G1 avec du facteur alpha 5 ug/ml. Les cellules ont par la suite été maintenues en G1, relâchées en phase S avec hydroxyurée ou relâchées 2h et 4h dans le nocodazole et irradiées avec 100J/m^2 UV. Le panneau de gauche représente les profils de quantification d'ADN marqué par Sytox Green. Le panneau de droit représente les pourcentages de CPD restants par rapport au signal initial.

Les cellules ayant un défaut de NER en phase S ont une augmentation de foyers RPA

Suite à la découverte de la nécessité de traverser la phase S et l'hypothèse selon laquelle des facteurs importants pour la réplcation et la réparation seraient séquestrés, plusieurs candidats pouvaient être sélectionnés (Auclair et al., 2010; Tsaalbi-Shtylik et al., 2014). L'un d'entre eux est la protéine RPA. Cette protéine protège l'ADN simple brin lors de la réplcation et est aussi importante pour la reconnaissance des dommages lors du NER. Un

aspect visuel connu des cellules possédant du stress réplicatif est la formation de foyers de protéines dont RPA fait partie (Lisby et al., 2004). La première étape était donc de regarder si RPA formait des foyers de protéines dans les mutants sélectionnés. La formation de foyers de protéines par microscopie fluorescente signifierait une agglomération de protéines à un endroit dans la cellule (Balajee and Geard, 2004). La sous-unité RFA1 a été marquée à l'aide du marqueur fluorescent GFP et analysé par microscopie à fluorescence. En concordance avec l'hypothèse postulée, ces mutants affichaient des foyers plus intenses et plus fréquents que dans une souche sauvage (Figure 11A). Afin d'obtenir des valeurs numériques comparables, la fraction des cellules portant des foyers a été comptée et portée en histogramme (Figure 11B). Il est possible de voir une augmentation de plus de 4 fois le nombre de cellules portant un foyer dans les mutants en comparaison avec les cellules normales. De plus, en utilisant l'aide d'un programme informatique, il a été possible de quantifier l'intensité de fluorescence de ces foyers (Figure 11C). Porté en graphique *boxplot*, ces résultats montrent bien l'augmentation d'intensité flagrante des foyers RPA pour les mutants comparativement à la souche sauvage. Pour s'assurer que ce n'était pas le résultat d'une augmentation de la quantité de RPA totale dans les mutants, une analyse par immunoblot a été effectuée mesurant la quantité totale de RPA dans des échantillons asynchrones (Figure 11D). Aucune augmentation significative n'a été détectée pour les 5 mutants sélectionnés. Ces résultats suggèrent qu'une quantité beaucoup plus importante de RPA est recrutée dans les foyers de protéines pour les mutants comparativement à la souche sauvage. À ce point, l'idée était qu'une partie du bassin de RPA était séquestré dans ces foyers de protéines, probablement résultant d'un recrutement extensif aux fourches de réplication bloquées ou effondrées des divisions précédentes, et qu'à cause de cela, il y avait une réduction dans la quantité de RPA pouvant être utilisé dans la cellule. Durant la phase S, la réplication de l'ADN requiert aussi une grande quantité de RPA pour, en autres, protéger l'ADN simple brin durant la réplication de l'ADN. La quantité déjà réduite de RPA serait alors diminuée à des niveaux encore plus bas. À ce niveau critique, sans la présence de dommages, presque aucun impact serait observable. Cependant, lors d'induction de dommages à l'ADN, comme dans le cas d'une irradiation UV, la quantité de RPA restante serait trop basse pour être utilisée pour le NER de manière efficace, ce qui expliquerait le ralentissement dans l'élimination des CPD. Dans le cas des phases G1 et G2, cette quantité globale réduite de RPA n'aurait pas d'impact puisqu'il n'y a pas de réplication d'ADN, donc

la quantité restante serait limitée, mais assez importante pour fournir à la réparation expliquant la réparation normale dans les phases G1 et G2.

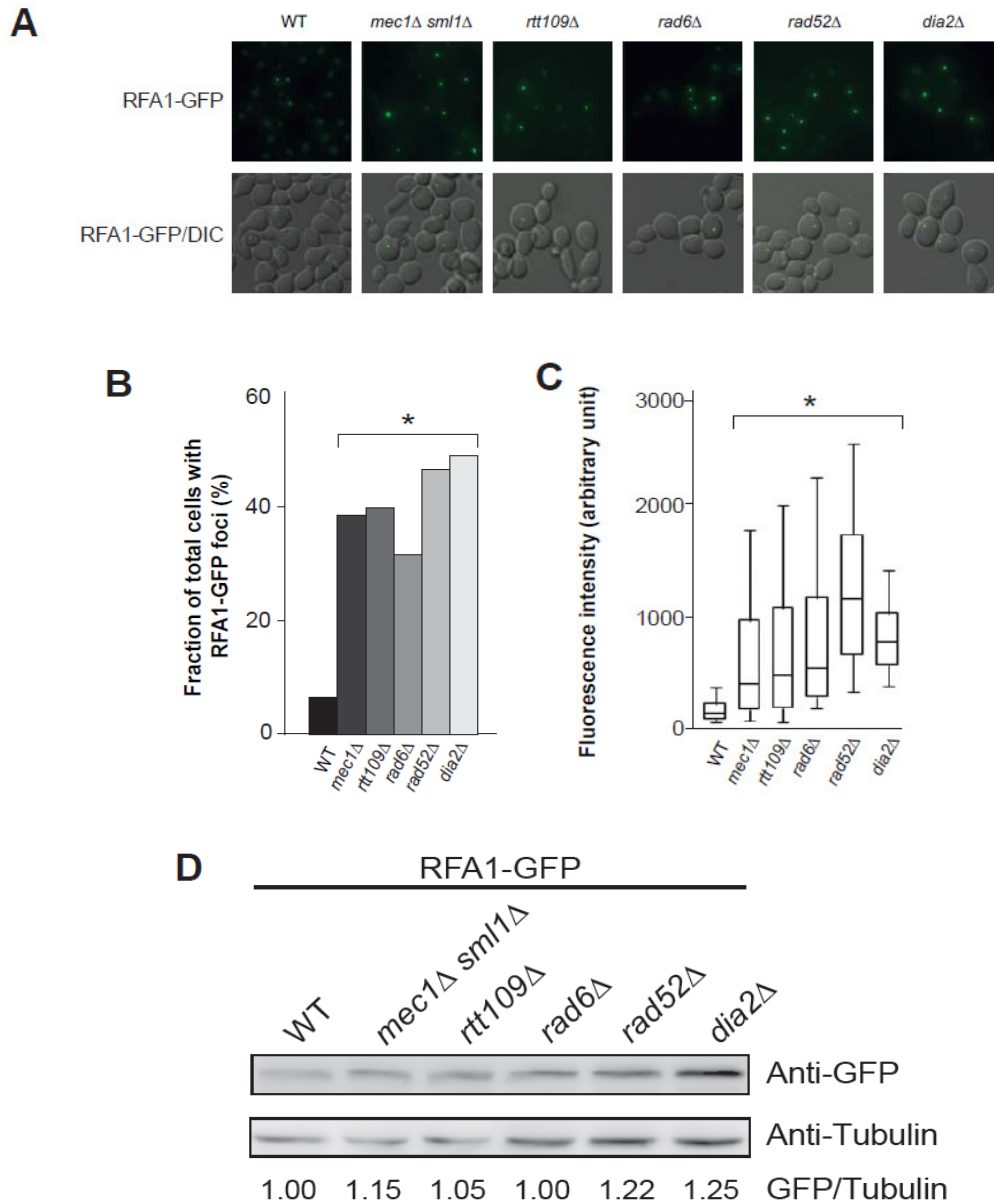


Figure 11. Les mutants déficients en NER durant la phase S ont une quantité plus importante de foyers RPA. Les cellules utilisées ont un marqueur GFP sur la sous-unité RFA1. Des cellules asynchrones ont été fixées à l'aide de formaldéhyde 3.7% et analysées par microscopie à fluorescence. **A.** Représentation imagée de la microscopie à fluorescence pour la souche WT ainsi que chacun des mutants. **B.** Histogramme représentant la quantité de cellules possédant un foyer par rapport à la quantité totale de cellules pour la souche WT et les 5 mutants choisis. **C.** Boxplot représentant l'intensité de fluorescence mesurée par programme informatique de la souche WT et des 5 mutants. **D.** Analyse par immunoblot de la quantité totale de protéine RPA via la détection de la sous-unité RFA1 marquée d'un GFP. La détection a été effectuée à l'aide d'un anticorps anti-GFP. La tubuline a été utilisée comme contrôle de protéines totales. Le rapport de la quantité de RPA total sur le niveau de tubuline a été effectué par densitométrie.

Une diminution partielle de la quantité de RPA induit un défaut de NER spécifiquement durant la phase S

Suivant ces résultats concernant la séquestration de RPA dans les foyers de protéines, l'hypothèse selon laquelle il serait peut-être possible de simuler un défaut de NER en phase S en induisant artificiellement la séquestration de RPA dans une souche sauvage a été émise. L'approche utilisée était de diminuer les niveaux de RPA dans une souche qui n'a pas de défaut en dégradant partiellement la quantité totale de RPA. Pour ce faire, le système de dégron a été choisi (Morawska and Ulrich, 2013). En marquant la sous-unité RFA1 à l'aide d'un dégron jumelé à un marqueur détectable par anticorps, il était possible de mesurer les niveaux de RPA par immunoblot. Le système dégron est relativement simple. L'ubiquitine ligase Tir1 peut reconnaître le marqueur (AID, auxin-induced degron) ajouté sur une protéine pour la dégrader via la voie ubiquitine-protéasome. Cependant, cette ubiquitination survient uniquement en présence d'auxine, acide acétique 3-inodole (Morawska and Ulrich, 2013). Il est donc possible de dégrader une protéine à un moment spécifique durant l'expérience. De plus, cette dégradation est dépendant de la concentration en auxine. La première étape était de marquer RFA1 dans une souche sauvage possédant l'ubiquitine ligase Tir1 avec le marqueur AID-Flag. Ensuite, les cellules ont été mises en présence ou en absence d'auxine pour induire une dégradation de la protéine RFA1, détruisant ainsi le complexe RPA, simulant une diminution des niveaux totaux de RPA. L'anticorps anti-flag a été utilisé pour détecter le signal de RFA1. Une dégradation partielle de la protéine a été observée en présence de 2 mM d'auxine (Figure 12A). Ensuite, la survie cellulaire a été observée à l'aide de dilutions sériées. La souche ne possédant pas le marqueur n'affiche aucun effet en présence prolongée d'auxine (Figure 12B avant-dernière ligne). Cependant, la souche possédant le marqueur voit une perte de viabilité significative en présence d'auxine (Figure 12B dernière ligne). Ce résultat est en accord avec le fait que la protéine RPA est essentielle à la survie cellulaire et une modification des niveaux peut induire un défaut majeur dans la ségrégation des chromosomes (Niu et al., 2008). Finalement, la souche sauvage, ainsi que le mutant *mec1Δ sml1Δ*, ont été utilisés comme contrôle et aucun effet significatif n'a pu être noté pour ces deux souches puisqu'elles ne possèdent pas la protéine Tir1 (Figure 12B haut). Plusieurs différents marqueurs de protéines ont été produits puisque certains avaient des phénotypes même en absence d'auxine,

probablement dû à une déstabilisation de la protéine RFA1 marquée du AID. Le marqueur AID-Myc possédait le meilleur taux de dégradation, c'est donc celui qui a été utilisé pour la suite des expériences. Les cellules synchronisées en phase S en présence d'auxine présentent une dégradation partielle de la quantité totale de RFA1 (Figure 12C haut, gauche). Cette réduction induit un défaut de NER durant la phase S comparativement à une souche n'ayant pas été exposée à l'auxine (Figure 12C bas, gauche). Par contre, les cellules synchronisées en phase G2 en présence d'auxine n'affichent aucun défaut de NER en phase G2 (Figure 12C bas, droit), même après une réduction similaire à celle observée chez les cellules synchronisées en phase S (Figure 12C haut, droit). Ces résultats démontrent qu'une réduction de la quantité de RPA via dégradation induit un défaut de NER spécifiquement durant la phase S.

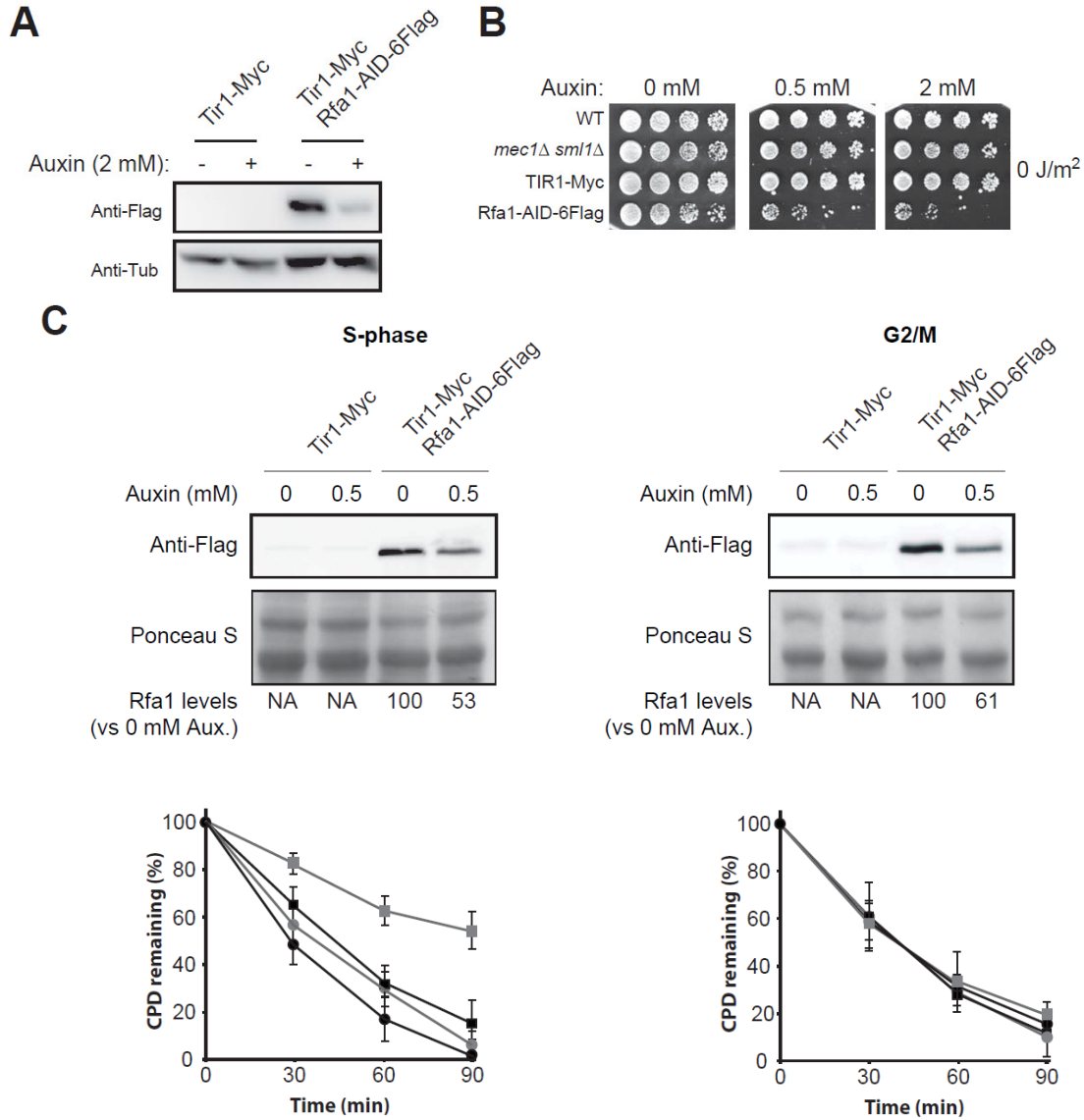


Figure 12. Une déplétion partielle de la quantité de RPA induit un défaut de NER spécifiquement durant la phase S. **A.** Une souche portant la protéine TIR1 ainsi que la protéine RFA1 marquée avec AID-Myc a été analysée par immunoblot et comparée à une souche qui ne portait que la protéine TIR1. Diminution partielle de la quantité de RPA par système dégron mesurée par immunoblot suite à une exposition à 2 mM d'auxine. **B.** Dilutions sériées représentant une perte de viabilité suite à une diminution de la quantité de RPA induite par le système dégron en présence de 0, 0.5 et 2 mM d'auxine. **C.** Analyse par immunoblot de la quantité de RFA1-AID-Myc pour des cellules synchronisées en phase S à l'aide de 200 mM d'hydroxyurée, ou en phase G2 avec nocodazole, en présence ou en absence de 0.5 mM d'auxine et l'analyse par cytométrie de l'efficacité de réparation des CPD. La diminution partielle de RPA induit un défaut de NER durant la phase S.

La surexpression de la sous-unité RPA1 est létale chez la levure

L'étape suivante était de surexprimer les sous-unités de RPA dans une souche déficiente afin de tenter d'éliminer le défaut de NER. Pour ce faire, des plasmides 2-micron ont été produits exprimant chacune des sous-unités de RPA (Gelperin et al., 2005). La surexpression des sous-unités de RPA semblait induire une forte létalité dans les cellules suite à une activation au galactose comparativement à la souche contrôle portant un plasmide vide (pYES2), similaire à celui observé dans d'autres études (Figure 13A) (Niu et al., 2008). Le plasmide utilisé porte, en plus d'un marqueur HA pour les protéines, un marqueur protéine A (PrA) qui sert lors de purifications de protéines. Dans le cas présent il n'était pas nécessaire, il a alors été éliminé. En utilisant la mutagenèse dirigée, le plasmide a été modifié et un codon *stop* a été placé juste devant la PrA. Malheureusement, cette modification n'a rien changé à la létalité lors de la surexpression (Figure 13B, 3 premières lignes). Une autre explication était que ce soit un débalancement dans la stœchiométrie du complexe suite à la surexpression d'une seule sous-unité qui causait cette létalité. Un plasmide de chacune des sous-unités a donc été introduit en même temps dans la même souche. La létalité restait même lors de la surexpression des 3 sous-unités simultanément (Figure 13C, 2 premières lignes). L'analyse par western blot a révélé que les niveaux de surexpression des sous-unités étant relativement élevés, il se pouvait que la surexpression soit trop importante et que ceci induisait un débalancement important dans la cellule (Figure 13D). Les plasmides 2-microns étant présents à plusieurs copies, un plasmide possédant que quelques copies pouvait peut-être résoudre le problème. Les sous-unités ont donc été clonées dans un plasmide surexprimant à moins haut niveau (pRS) favorisant une surexpression minimale des sous-unités. Même en réduisant significativement les niveaux de surexpression, la létalité restait présente, que ce soit la surexpression d'une seule sous-unité, avec ou sans PrA (Figure 13B, 2 dernières lignes) ou lorsque les 3 sous-unités sont surexprimées dans la même souche, avec ou sans PrA (Figure 13C, 2 dernières lignes). Malheureusement, selon les résultats obtenus et la méthodologie utilisée, la surexpression de RPA n'était pas possible chez la levure puisqu'elle induit une mort cellulaire. Cette observation avait déjà été faite auparavant dans une autre étude où RPA1 était surexprimé (Niu et al., 2008). La raison de cette létalité reste inconnue et de plus amples expérimentations seront nécessaires pour élucider le problème. Il était impossible de confirmer

hors de tous doutes que l'effet observé était causé uniquement par la séquestration de RPA chez la levure.

Cependant, il existait déjà un plasmide de surexpression possédant les 3 sous-unités chez l'humain (Toledo et al., 2013). En utilisant ce plasmide, une approche différente pouvait être effectuée puisque ce plasmide produisait les 3 sous-unités sous la régulation du même ARNm. Grâce à cela, les 3 sous-unités étaient stoechiométriquement identiques. Cette approche a permis à un collègue du laboratoire de faire des expériences dans les cellules humaines. En concordance avec les résultats précédents, il a pu démontrer que la surexpression de RPA chez l'humain éliminait le défaut de NER observé spécifiquement durant la phase S (Annexe 1).

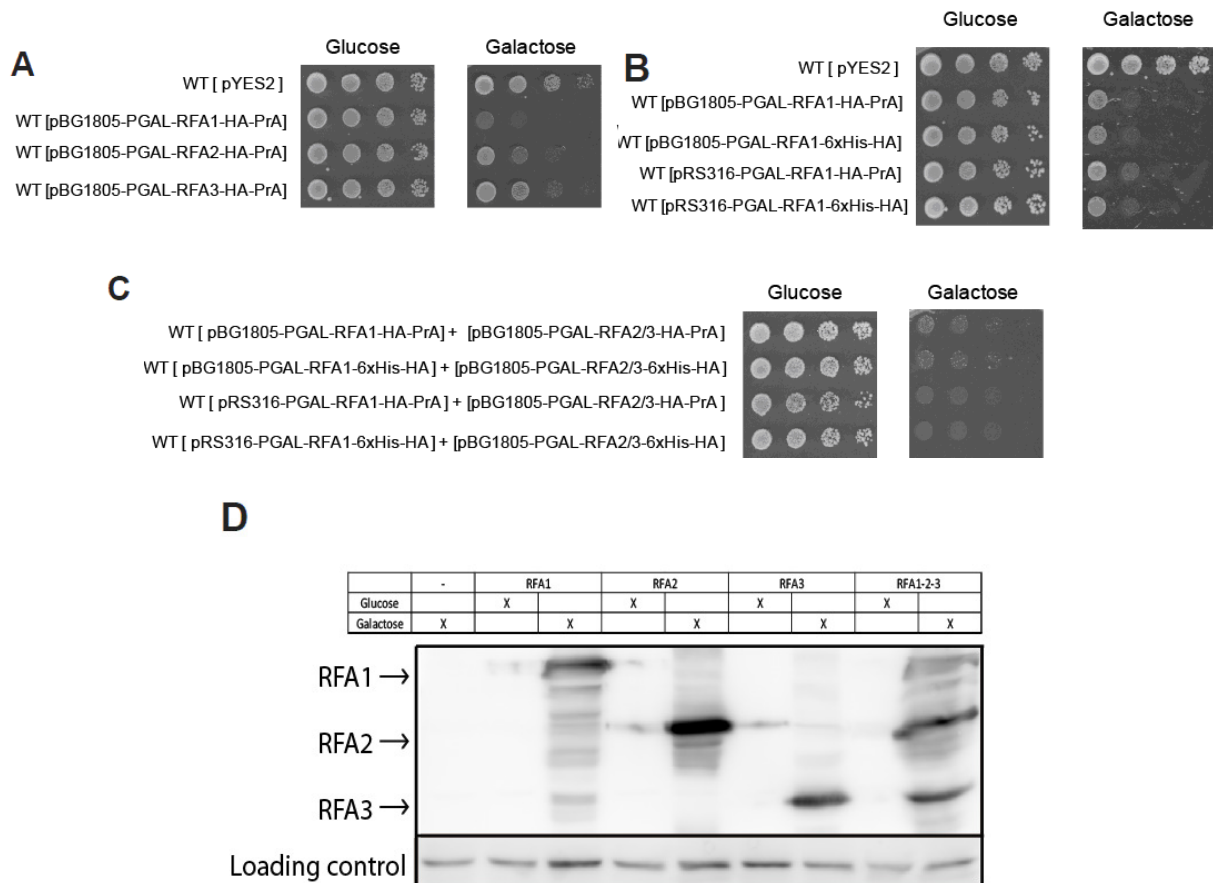


Figure 13. La surexpression des sous-unités de RPA est létale. **A.** Test de survie par dilutions sériées représentant la surexpression des sous-unités RPA1, RPA2 et RPA3 sous promoteur galactose en présence de glucose ou de galactose. **B.** Test de survie par dilutions sériées représentant la surexpression de RPA1 sous promoteur galactose en présence ou en absence de la séquence PrA dans un plasmide à forte expression 2-micron ou dans un plasmide à faible expression avec glucose ou galactose. **C.** Test de survie par dilutions sériées représentant la surexpression des sous-unités de RPA sous promoteur galactose en présence ou en absence de la séquence PrA. Comparaison entre la surexpression de RPA1 dans un plasmide à forte expression 2-micron et un plasmide à faible expression en présence d'une surexpression forte des sous-unités RPA2 et RPA3. **D.** Analyse par western blot de la surexpression des sous-unités de RPA en présence de glucose ou de galactose.

Discussion

L'étude décrit dans cette thèse vise à élucider l'effet précédemment identifié chez l'humain du défaut d'élimination des CPD dans des cellules déficientes en ATR survenant uniquement durant la phase S (Auclair et al., 2008). Elle vise aussi à expliquer le défaut de NER observé dans les cellules XPV, déficientes pour la polymérase η , spécifique à la phase S (Auclair et al., 2010). La complexité importante du mécanisme de réparation impliquant ATR chez l'humain rend la tâche extrêmement difficile et c'est pourquoi le modèle de la levure *S.cerevisiae* a été sélectionné. Grâce à sa grande facilité d'utilisation et son énorme malléabilité génétique, ce modèle peut permettre une compréhension plus aisée des mécanismes impliqués et une simplicité d'expérimentation.

Dans les recherches publiées précédemment, une technique de cytométrie en flux a été utilisée pour mesurer la vitesse d'élimination des CPD chez l'humain et une approche similaire a été prise pour obtenir les résultats de ce mémoire (Auclair et al., 2008). Malheureusement, l'essai développé ne s'appliquait pas directement chez la levure, il a donc été nécessaire d'adapter ce protocole. Chez la levure, le mutant *rad4 Δ* est complètement déficient en NER, il a été possible de l'utiliser comme contrôle négatif pour les tests préliminaires. Selon les résultats obtenus, une délétion de Rad4 affiche un défaut complet dans l'élimination des CPD par cytométrie en flux renforçant la validité de l'expérimentation choisie. De plus, ce résultat a pu être confirmé en utilisant une méthode éprouvée de slotblot (Figure 7). La technique de cytométrie en flux développée est reproductible et quantitative en plus d'être indépendante de la quantité d'ADN disponible. Elle permet l'analyse du NER en fonction du cycle cellulaire, mais son incapacité à différencier entre les deux sous-voies de NER, le GG-NER et le TC-NER, la rend imparfaite. Cependant, il est théoriquement possible d'utiliser cette méthode pour évaluer l'efficacité de réparation de d'autres mécanismes et lésions si des anticorps spécifiques sont disponibles. Grâce à cette nouvelle méthode, il a été possible de démontrer que le mutant *mec1 Δ sml1 Δ* affichait un défaut de NER semblable à l'homologue mutant humain d'ATR (Figure 8). Ces résultats démontrent que Mec1 est nécessaire au bon fonctionnement de la réparation par excision de nucléotide durant la phase S. Puisque les mécanismes sont similaires entre ces deux modèles, il est alors possible d'étudier le défaut de NER chez la levure dans l'intention d'appliquer les découvertes

obtenues au modèle humain. La grande majorité des voies de signalisation découlant de l'activation de Mec1 sont similaires à celles activées par ATR, l'idée postulée ici est d'identifier les joueurs importants dans la cascade de signalisation sous-jacente à Mec1 et déterminer leurs rôles dans la régulation du NER spécifiquement durant la phase S pour ensuite les appliquer à l'humain. Une étude précédente a démontré un défaut de NER spécifiquement au locus RPB2 lors d'une délétion du gène Mec1 (Taschner et al., 2010). De façon surprenante, les résultats obtenus dans cette étude sont contraires à ceux obtenus ici. Ils observent un défaut de NER important dans des cellules asynchrones, sous-entendant un défaut dans toutes les phases du cycle cellulaire. Cette incohérence avec les résultats présents pourrait provenir de l'expérimentation utilisée. Les résultats présents englobent l'entièreté du génome alors que leurs résultats ne sont spécifiques que pour le gène RPB2. Cependant, très peu d'information est disponible pour les autres protéines de la voie de signalisation dépendante de Mec1. Le mutant *rad26Δ*, une protéine effectrice directement liée à Mec1, a aussi été analysé dans cette recherche et leurs résultats suggèrent que la phosphorylation de Rad26 serait nécessaire pour éviter l'apparition du défaut de NER, spécifiquement au niveau des sites transcrits. Malheureusement, l'essai développé pour ce mémoire ne permet pas de différencier entre le TC-NER et le GG-NER, il a donc été impossible de conclure sur cet aspect. Cependant, le mutant *rad26Δ* démontre un léger défaut de NER durant la phase S pouvant suggérer que Rad26 soit responsable d'une partie du problème (Figure 8) . De plus, l'analyse des résultats obtenus pour le mutant *rad53Δ sml1Δ* suggèrent qu'une délétion induit un défaut similaire à la délétion de Mec1. En plus d'analyser l'impact des protéines Rad26 et Rad53 sur la réparation des CPD, l'essai de cytométrie en flux développé a été utilisé pour élucider le rôle de différentes autres protéines impliquées dans divers mécanismes cellulaires différents. Les protéines Rtt109, Rad6, Rad52 et Dia2 ont été sélectionnée et étudiées en profondeur parce qu'elles possédaient un niveau élevé de foyers de protéines Rad52 suggérant une sensibilité au stress répliatif (Alvaro et al., 2007). Le fait que la délétion de ces gènes impliqués dans des voies qui ne semblent pas être interconnectées induit un défaut de NER spécifiquement durant la phase S suggérait qu'il existait un élément commun encore méconnu. À partir de là, une panoplie de mutants reconnus comme ayant du stress répliatif, via une quantité de foyers spontanés Rad52 élevée, ont été étudiés et caractérisés pour leur efficacité de NER. Différents niveaux de défaut de NER ont été observés, mais aucune corrélation n'a

pu être déterminée entre la quantité de foyers Rad52 et l'intensité du défaut de NER. Une raison pouvant expliquer cette incohérence pourrait provenir du fait que certaines souches seraient plus susceptibles d'induire des dommages à l'ADN dans les autres phases du cycle cellulaire et que ces dommages ne seraient pas réparés avant l'entrée en phase S, ce qui impliquerait une diminution de l'efficacité de réparation spécifiquement durant la phase S. Malheureusement, le mécanisme exact expliquant ces résultats reste à être élucidé et de plus amples expérimentations seront nécessaires.

La diversité des mécanismes touchés par ce défaut de NER suggère que ce n'est pas une déficience dans la régulation du NER, mais plutôt un problème dans un mécanisme commun à tous ces voies de signalisation. Ces mutations impliqueraient donc des rôles indirects en plus des complications déjà causées par leur état inadéquat. Ces effets peuvent empirer une situation déjà critique en augmentant la formation de fourches bloquées ce qui implique la possibilité d'effondrement, menant ultimement à des délétions et à une perte de viabilité. Les résultats démontrés dans la figure 9 stipulent que le défaut de NER est dépendant de l'initiation de la réplication. Cette observation a permis de suggérer qu'il pourrait y avoir des facteurs importants requis pour la réplication qui seraient emprisonnés dans le complexe du réplisome et qu'il serait impossible de les utiliser pour leurs autres fonctions. Plusieurs protéines ont été sélectionnées comme candidats, RPA, PCNA et la polymérase delta en sont des exemples. Cependant, un candidat semblait plus propice pour expliquer ce défaut, la protéine RPA. Des études précédentes ont démontré une accumulation d'ADN simple brin suite à l'apparition de stress répliatif causé par le découplage entre l'hélicase et la polymérase à ADN (Cortez, 2005). Cette accumulation d'ADN simple brin est recouverte de RPA afin de stabiliser et de protéger la structure instable qu'est l'ADN simple brin. Ce recrutement important de RPA sur l'ADN peut dépléter le RPA cellulaire impliquant une inhibition des mécanismes RPA-dépendant. Une hypothèse similaire avait déjà été suggérée dans des recherches précédentes pour expliquer le défaut de NER en phase S (Auclair et al., 2008). En ce sens, une étude publiée récemment a démontré qu'un stress répliatif causé par un défaut en ATR déplétait fortement les niveaux de RPA cellulaire (Toledo et al., 2013). De plus, une autre étude publiée suggère qu'un stress répliatif induit par hydroxyurée dans des cellules déficientes dans la polymérase à transléision Rev3 causerait un défaut de NER dépendant

d'une incapacité à recruter RPA aux sites de dommages (Tsaalbi-Shtylik et al., 2014). Il est important de se rappeler que RPA est aussi nécessaire pour la réparation par excision de nucléotides, plus spécifiquement durant la phase de pré-incision et de reconnaissance (Heyer et al., 1990). Ces résultats, en plus de ceux obtenus dans les expérimentations présentes, ont permis de suggérer qu'une séquestration de RPA au niveau des sites de stress réplicatif dans les mutants utilisés empêcherait son recrutement au niveau du NER ce qui inhiberait fortement l'efficacité de réparation durant la phase S. D'autres observations appuient cette hypothèse et renforcent l'idée selon laquelle RPA pourrait être la principale cause de ce défaut. Par exemple, une déficience dans la réparation de l'ADN double brin causé par la protéine Spo11 durant la méiose induit une accumulation importante de RPA sur l'ADN simple brin ce qui inhibe fortement la réparation de dommages doubles brins causés ultérieurement (Johnson et al., 2007). En ce sens, la présence d'une augmentation de la formation de foyers RPA dans les mutants utilisés ici indiquerait une diminution de la quantité de RPA libre pour la NER. De plus, le fait qu'une réduction partielle de la quantité de RPA, via la dégradation à l'aide d'un dégron, induisait un défaut de NER spécifique à la phase S dans des cellules n'ayant précédemment pas de défaut renforce cette idée (Figure 12). Chez l'humain, deux études appuient cette hypothèse. La première démontre que des fibroblastes murins Rev3^{-/-}, déficient dans la polymérase η et les rendant inapte à utiliser le mécanisme de tolérance aux dommages UV ce qui engendre une grande quantité de stress réplicatif, affichent un recrutement défectueux de RPA aux sites de lésions UV (Tsaalbi-Shtylik et al., 2014). Deuxièmement, il a été démontré que des cellules traitées au HU, produisant du stress réplicatif, cotraitées avec un inhibiteur d'ATR induisait la production d'une quantité importante d'ADN simple brin réduisant considérablement la quantité de RPA libre. Cette situation précaire pouvait être empirée en diminuant la quantité de RPA ou partiellement résolue en la surexprimant (Toledo et al., 2013). Malheureusement, il a été impossible de surexprimer RPA chez la levure afin de tenter d'éliminer le défaut dans des cellules déficientes en NER durant la phase S à cause de la létalité de cette surexpression, létalité caractérisée dans d'autres études (Niu et al., 2008).

Cependant, d'autres expérimentations effectuées par des collègues ont démontrées qu'une surexpression de RPA chez l'humain réduisait grandement le défaut de NER observé

en phase S pour une souche déficiente en ATR (Annexe 1). De plus, plusieurs souches cancéreuses portant un niveau élevé de défaut de NER durant la phase S ont été analysées et leur défaut était, eux-aussi, résolu. Cette réussite suggère que la séquestration de RPA pourrait avoir un rôle à jouer dans la formation de cellules portant un niveau élevé de stress réplicatif, condition pouvant favoriser la formation de cellules précancéreuses. Il est aussi possible de croire que le défaut de NER ne soit pas la seule conséquence d'une séquestration de RPA et que d'autres mécanismes RPA-dépendants, la recombinaison homologue par exemple, soient affectés. RPA étant requis pour ce mécanisme, une déficience dans la réparation des cassures double brins pourrait être mesurée spécifiquement durant la phase S. Une diminution de l'efficacité de réparation lors de la présence d'une séquestration de RPA viendrait accentuer l'exactitude de l'hypothèse présente. Des études précédentes démontraient qu'une majorité des mélanomes humains possédaient une déficience en réparation par excision de nucléotides spécifiquement durant la phase S (Bélanger et al., 2014) suggérant que ce phénotype cancéreux pourrait peut-être être une conséquence globale de la séquestration de RPA. Cependant, le mécanisme exact par lequel la séquestration de RPA impacte la réparation par excision de nucléotide n'a pas été élucidé avec cette étude et de plus amples expériences seront nécessaires pour déterminer dans quelles séquences les événements se déroulent.

Conclusion

Cette étude apporte une conclusion importante sur un nouveau mécanisme dépendant de la séquestration de facteurs, ici de RPA, et de leur impact sur les autres mécanismes utilisant ces facteurs. Ces résultats supportent l'idée selon laquelle, chez la levure, une séquestration de RPA au niveau de fourches de réplication bloquées inhibe fortement l'élimination des CPD spécifiquement durant la phase S, et donc de leur réparation via NER. Ils favorisent aussi la compréhension du mécanisme homologue humain et permettent ultimement de comprendre les mécanismes impliqués dans la formation d'une instabilité génomique. Il serait donc important de déterminer si ce défaut spécifique à la phase S est une caractéristique de la majorité des cancers puisqu'il pourrait être utilisé pour améliorer l'impact des agents chimiothérapeutiques, tel que le cisplatine, agissant de manière à produire des

lésions similaires aux rayons UV. Cette nouvelle approche de létalité synthétique pourrait permettre le développement de nouveaux traitements plus efficaces pour le cancer.

Bibliographie

- Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C.L., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100, 224–233. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb04778.x
- Alvaro, D., Lisby, M., Rothstein, R., 2007. Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS Genet.* 3, e228. doi:10.1371/journal.pgen.0030228
- Auclair, Y., Rouget, R., Affar, E.B., Drobetsky, E.A., 2008. ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17896–17901. doi:10.1073/pnas.0801585105
- Auclair, Y., Rouget, R., Belisle, J.M., Costantino, S., Drobetsky, E.A., 2010. Requirement for functional DNA polymerase eta in genome-wide repair of UV-induced DNA damage during S phase. *DNA Repair* 9, 754–764. doi:10.1016/j.dnarep.2010.03.013
- Bähler, J., 2005. Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu. Rev. Genet.* 39, 69–94. doi:10.1146/annurev.genet.39.110304.095808
- Balajee, A.S., Geard, C.R., 2004. Replication protein A and gamma-H2AX foci assembly is triggered by cellular response to DNA double-strand breaks. *Exp. Cell Res.* 300, 320–334. doi:10.1016/j.yexcr.2004.07.022
- Bartek, J., Lukas, J., 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421–429. doi:10.1016/S1535-6108(03)00110-7
- Batista, L.F.Z., Kaina, B., Meneghini, R., Menck, C.F.M., 2009. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat. Res.* 681, 197–208. doi:10.1016/j.mrrev.2008.09.001
- Baylin, S.B., Herman, J.G., 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* TIG 16, 168–174.
- Bélanger, F., Rajotte, V., Drobetsky, E.A., 2014. A majority of human melanoma cell lines exhibits an S phase-specific defect in excision of UV-induced DNA photoproducts. *PloS One* 9, e85294. doi:10.1371/journal.pone.0085294
- Bell, S.P., Dutta, A., 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 333–374. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135425

Beranek, D.T., 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 231, 11–30. doi:10.1016/0027-5107(90)90173-2

Berneburg, M., Lehmann, A.R., 2001. Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and transcription. *Adv. Genet.* 43, 71–102.

Beyer, T., Weinert, T., 2014. Mec1 and Tel1: an arresting dance of resection. *EMBO J.* 33, 176–178. doi:10.1002/emboj.201387440

Bi, E., Park, H.-O., 2012. Cell Polarization and Cytokinesis in Budding Yeast. *Genetics* 191, 347–387. doi:10.1534/genetics.111.132886

Bird, A., 1992. The essentials of DNA methylation. *Cell* 70, 5–8. doi:10.1016/0092-8674(92)90526-I

Birger, Y., West, K.L., Postnikov, Y.V., Lim, J.-H., Furusawa, T., Wagner, J.P., Laufer, C.S., Kraemer, K.H., Bustin, M., 2003. Chromosomal protein HMGN1 enhances the rate of DNA repair in chromatin. *EMBO J.* 22, 1665–1675. doi:10.1093/emboj/cdg142

Boos, D., Sanchez-Pulido, L., Rappas, M., Pearl, L.H., Oliver, A.W., Ponting, C.P., Diffley, J.F.X., 2011. Regulation of DNA replication through Sld3-Dpb11 interaction is conserved from yeast to humans. *Curr. Biol. CB* 21, 1152–1157. doi:10.1016/j.cub.2011.05.057

Brutlag, D., Kornberg, A., 1972. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. 36. A proofreading function for the 3' leads to 5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases. *J. Biol. Chem.* 247, 241–248.

Butler, G., Thiele, D.J., 1991. ACE2, an activator of yeast metallothionein expression which is homologous to SWI5. *Mol. Cell. Biol.* 11, 476–485.

Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M., Walter, J.C., Cimprich, K.A., 2005. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 19, 1040–1052. doi:10.1101/gad.1301205

Caldecott, K.W., 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 619–631. doi:10.1038/nrg2380

Camenisch, U., Nägeli, H., 2008. XPA gene, its product and biological roles. *Adv. Exp. Med. Biol.* 637, 28–38.

Cangi, M.G., Cukor, B., Soung, P., Signoretti, S., Moreira, G., Ranashinge, M., Cady, B., Pagano, M., Loda, M., 2000. Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* 106, 753–761. doi:10.1172/JCI9174

Chen, S.-H., Zhou, H., 2009. Reconstitution of Rad53 activation by Mec1 through adaptor protein Mrc1. *J. Biol. Chem.* 284, 18593–18604. doi:10.1074/jbc.M109.018242

Cheung-Ong, K., Giaever, G., Nislow, C., 2013. DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. *Chem. Biol.* 20, 648–659. doi:10.1016/j.chembiol.2013.04.007

Christmann, M., Verbeek, B., Roos, W.P., Kaina, B., 2011. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim. Biophys. Acta* 1816, 179–190. doi:10.1016/j.bbcan.2011.06.002

Coin, F., Oksenysh, V., Egly, J.-M., 2007. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol. Cell* 26, 245–256. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.009

Compere, S.J., Palmiter, R.D., 1981. DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene lymphoid cells. *Cell* 25, 233–240.

Cortez, D., 2005. Unwind and slow down: checkpoint activation by helicase and polymerase uncoupling. *Genes Dev.* 19, 1007–1012. doi:10.1101/gad.1316905

Craven, R.J., Greenwell, P.W., Dominska, M., Petes, T.D., 2002. Regulation of genome stability by TEL1 and MEC1, yeast homologs of the mammalian ATM and ATR genes. *Genetics* 161, 493–507.

Cruet-Hennequart, S., Gallagher, K., Sokòl, A.M., Villalan, S., Prendergast, A.M., Carty, M.P., 2010. DNA polymerase eta, a key protein in translesion synthesis in human cells. *Subcell. Biochem.* 50, 189–209. doi:10.1007/978-90-481-3471-7_10

de Laat, W.L., Jaspers, N.G., Hoeijmakers, J.H., 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 13, 768–785.

de Padula, M., Slezak, G., Auffret van Der Kemp, P., Boiteux, S., 2004. The post-replication repair RAD18 and RAD6 genes are involved in the prevention of spontaneous mutations caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 32, 5003–5010. doi:10.1093/nar/gkh831

- Dianov, G.L., Sleeth, K.M., Dianova, I.I., Allinson, S.L., 2003. Repair of abasic sites in DNA. *Mutat. Res.* 531, 157–163.
- DiGiovanna, J.J., Kraemer, K.H., 2012. Shining a Light on Xeroderma Pigmentosum. *J. Invest. Dermatol.* 132, 785–796. doi:10.1038/jid.2011.426
- Din, S., Brill, S.J., Fairman, M.P., Stillman, B., 1990. Cell-cycle-regulated phosphorylation of DNA replication factor A from human and yeast cells. *Genes Dev.* 4, 968–977.
- Donaldson, A.D., Fangman, W.L., Brewer, B.J., 1998. Cdc7 is required throughout the yeast S phase to activate replication origins. *Genes Dev.* 12, 491–501.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Dudás, A., Chovanec, M., 2004. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat. Res.* 566, 131–167. doi:10.1016/j.mrrev.2003.07.001
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. doi:10.1080/01926230701320337
- Fanning, E., Klimovich, V., Nager, A.R., 2006. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res.* 34, 4126–4137. doi:10.1093/nar/gkl550
- Fernandez-Capetillo, O., Celeste, A., Nussenzweig, A., 2003. Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle Georget. Tex* 2, 426–427.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D’Errico, M., Simonelli, V., Dogliotti, E., 2003. 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat. Res.* 531, 127–139.
- Fousteri, M., Mullenders, L.H.F., 2008. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 18, 73–84. doi:10.1038/cr.2008.6
- Friedberg, E.C., Lehmann, A.R., Fuchs, R.P.P., 2005. Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol. Cell* 18, 499–505. doi:10.1016/j.molcel.2005.03.032
- Friedberg, E.C., Walker, G., Siede, W., Schultz, R., Siede, W., 2006. DNA repair and mutagenesis., 2nd ed. ed. ASM Press, Washington.

Fu, D., Calvo, J.A., Samson, L.D., 2012. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat. Rev. Cancer* 12, 104–120. doi:10.1038/nrc3185

Fuss, J.O., Tainer, J.A., 2011. XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase. *DNA Repair* 10, 697–713. doi:10.1016/j.dnarep.2011.04.028

Gates, K.S., 2009. An Overview of Chemical Processes That Damage Cellular DNA: Spontaneous Hydrolysis, Alkylation, and Reactions with Radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1747–1760. doi:10.1021/tx900242k

Gelperin, D.M., White, M.A., Wilkinson, M.L., Kon, Y., Kung, L.A., Wise, K.J., Lopez-Hoyo, N., Jiang, L., Piccirillo, S., Yu, H., Gerstein, M., Dumont, M.E., Phizicky, E.M., Snyder, M., Grayhack, E.J., 2005. Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection. *Genes Dev.* 19, 2816–2826. doi:10.1101/gad.1362105

Ghosal, G., Chen, J., 2013. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Transl. Cancer Res.* 2, 107–129. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.01

Groth, P., Ausländer, S., Majumder, M.M., Schultz, N., Johansson, F., Petermann, E., Helleday, T., 2010. Methylated DNA causes a physical block to replication forks independently of damage signalling, O(6)-methylguanine or DNA single-strand breaks and results in DNA damage. *J. Mol. Biol.* 402, 70–82. doi:10.1016/j.jmb.2010.07.010

Gulston, M., Fulford, J., Jenner, T., de Lara, C., O'Neill, P., 2002. Clustered DNA damage induced by gamma radiation in human fibroblasts (HF19), hamster (V79-4) cells and plasmid DNA is revealed as Fpg and Nth sensitive sites. *Nucleic Acids Res.* 30, 3464–3472.

Haase, S.B., Reed, S.I., 2002. Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle Georget. Tex* 1, 132–136.

Han, J., Zhou, H., Horazdovsky, B., Zhang, K., Xu, R.-M., Zhang, Z., 2007. Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. *Science* 315, 653–655. doi:10.1126/science.1133234

He, J., Zhu, Q., Wani, G., Sharma, N., Han, C., Qian, J., Pentz, K., Wang, Q., Wani, A.A., 2014. Ubiquitin-specific protease 7 regulates nucleotide excision repair through deubiquitinating XPC protein and preventing XPC protein from undergoing ultraviolet light-induced and VCP/p97 protein-regulated proteolysis. *J. Biol. Chem.* 289, 27278–27289. doi:10.1074/jbc.M114.589812

- Hendry, L.B., Bransome, E.D., Mahesh, V.B., 1998. The ligand insertion hypothesis in the genomic action of steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65, 75–89.
- Hendry, L.B., Mahesh, V.B., Bransome, E.D., Ewing, D.E., 2007. Small molecule intercalation with double stranded DNA: implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. *Mutat. Res.* 623, 53–71. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.03.009
- Heyer, W.D., Rao, M.R., Erdile, L.F., Kelly, T.J., Kolodner, R.D., 1990. An essential *Saccharomyces cerevisiae* single-stranded DNA binding protein is homologous to the large subunit of human RP-A. *EMBO J.* 9, 2321–2329.
- He, Z., Henricksen, L.A., Wold, M.S., Ingles, C.J., 1995a. RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature* 374, 566–569. doi:10.1038/374566a0
- He, Z., Henricksen, L.A., Wold, M.S., Ingles, C.J., 1995b. RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature* 374, 566–569. doi:10.1038/374566a0
- Hill-Perkins, M., Jones, M.D., Karran, P., 1986. Site-specific mutagenesis in vivo by single methylated or deaminated purine bases. *Mutat. Res.* 162, 153–163.
- Holick, M.F., 2008. Sunlight, UV-radiation, vitamin D and skin cancer: how much sunlight do we need? *Adv. Exp. Med. Biol.* 624, 1–15. doi:10.1007/978-0-387-77574-6_1
- Hopfield, J.J., 1974. Kinetic Proofreading: A New Mechanism for Reducing Errors in Biosynthetic Processes Requiring High Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 4135–4139.
- Houtsmuller, A.B., Rademakers, S., Nigg, A.L., Hoogstraten, D., Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W., 1999. Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science* 284, 958–961.
- Huang, Y., Li, L., 2013. DNA crosslinking damage and cancer - a tale of friend and foe. *Transl. Cancer Res.* 2, 144–154. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.03.01
- Johnson, R., Borde, V., Neale, M.J., Bishop-Bailey, A., North, M., Harris, S., Nicolas, A., Goldman, A.S.H., 2007. Excess single-stranded DNA inhibits meiotic double-strand break repair. *PLoS Genet.* 3, e223. doi:10.1371/journal.pgen.0030223
- Jossen, R., Bermejo, R., 2013. The DNA damage checkpoint response to replication stress: A Game of Forks. *Cancer Genet.* 4, 26. doi:10.3389/fgene.2013.00026

- Karran, P., Lindahl, T., 1980. Hypoxanthine in deoxyribonucleic acid: generation by heat-induced hydrolysis of adenine residues and release in free form by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus. *Biochemistry (Mosc.)* 19, 6005–6011.
- Kelland, L., 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 573–584. doi:10.1038/nrc2167
- Khanna, K.K., Jackson, S.P., 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27, 247–254. doi:10.1038/85798
- Kim, J.-A., Kruhlak, M., Dotiwala, F., Nussenzweig, A., Haber, J.E., 2007. Heterochromatin is refractory to γ -H2AX modification in yeast and mammals. *J. Cell Biol.* 178, 209–218. doi:10.1083/jcb.200612031
- Koepp, D.M., Kile, A.C., Swaminathan, S., Rodriguez-Rivera, V., 2006. The F-Box Protein Dia2 Regulates DNA Replication. *Mol. Biol. Cell* 17, 1540–1548. doi:10.1091/mbc.E05-09-0884
- Koranda, M., Schleiffer, A., Endler, L., Ammerer, G., 2000. Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G2/M-specific promoters. *Nature* 406, 94–98. doi:10.1038/35017589
- Kumar, R., Reynolds, D.M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Goldstone, S.D., Dalton, S., 2000. Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p, collaborate with Mcm1p to control transcription required for M-phase. *Curr. Biol. CB* 10, 896–906.
- Kuo, L.J., Yang, L.-X., 2008. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *Vivo Athens Greece* 22, 305–309.
- Lee, C.-H., Wu, S.-B., Hong, C.-H., Yu, H.-S., Wei, Y.-H., 2013. Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6414–6435. doi:10.3390/ijms14036414
- Lee, S.H., Kim, D.K., Drissi, R., 1995. Human xeroderma pigmentosum group A protein interacts with human replication protein A and inhibits DNA replication. *J. Biol. Chem.* 270, 21800–21805.
- Lehmann, A.R., 2003. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 85, 1101–1111.
- Lehmann, A.R., Kirk-Bell, S., Arlett, C.F., Paterson, M.C., Lohman, P.H., de Weerd-Kastelein, E.A., Bootsma, D., 1975. Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of

excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 219–223.

Lew, D.J., Kornbluth, S., 1996. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 795–804.

Liao, H., Thorner, J., 1980. Yeast mating pheromone alpha factor inhibits adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1898–1902.

Lieber, M.R., 2010. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181–211. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131

Li, J., Wang, Q.-E., Zhu, Q., El-Mahdy, M.A., Wani, G., Praetorius-Ibba, M., Wani, A.A., 2006. DNA damage binding protein component DDB1 participates in nucleotide excision repair through DDB2 DNA-binding and cullin 4A ubiquitin ligase activity. *Cancer Res.* 66, 8590–8597. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1115

Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715. doi:10.1038/362709a0

Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., Rothstein, R., 2004. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 118, 699–713. doi:10.1016/j.cell.2004.08.015

Liu, L., Lee, S., Zhang, J., Peters, S.B., Hannah, J., Zhang, Y., Yin, Y., Koff, A., Ma, L., Zhou, P., 2009. CUL4A Abrogation Augments DNA Damage Response and Protection Against Skin Carcinogenesis. *Mol. Cell* 34, 451–460. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.020

Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A.S.H., Helleday, T., 2005. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 33, 3799–3811. doi:10.1093/nar/gki681

MacDougall, C.A., Byun, T.S., Van, C., Yee, M., Cimprich, K.A., 2007. The structural determinants of checkpoint activation. *Genes Dev.* 21, 898–903. doi:10.1101/gad.1522607

Makridakis, N.M., Reichardt, J.K.V., 2012. Translesion DNA Polymerases and Cancer. *Front. Genet.* 3. doi:10.3389/fgene.2012.00174

Malumbres, M., Barbacid, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 9, 153–166. doi:10.1038/nrc2602

- Masai, H., Arai, K.-I., 2002. Cdc7 kinase complex: a key regulator in the initiation of DNA replication. *J. Cell. Physiol.* 190, 287–296. doi:10.1002/jcp.10070
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., Oda, M., 2010. Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How? *Annu. Rev. Biochem.* 79, 89–130. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.103205
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., Hanaoka, F., 1999. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature* 399, 700–704. doi:10.1038/21447
- Mazouzi, A., Velimezi, G., Loizou, J.I., 2014. DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Exp. Cell Res., DNA DAMAGE AND REPAIR* 329, 85–93. doi:10.1016/j.yexcr.2014.09.030
- McInerney, C.J., Partridge, J.F., Mikesell, G.E., Creemer, D.P., Breeden, L.L., 1997. A novel Mcm1-dependent element in the SWI4, CLN3, CDC6, and CDC47 promoters activates M/G1-specific transcription. *Genes Dev.* 11, 1277–1288.
- McMurray, C.T., van Holde, K.E., 1986. Binding of ethidium bromide causes dissociation of the nucleosome core particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 8472–8476.
- Melis, J.P.M., Luijten, M., Mullenders, L.H.F., van Steeg, H., 2011. The role of XPC: implications in cancer and oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 728, 107–117. doi:10.1016/j.mrrev.2011.07.001
- Mimura, S., Masuda, T., Matsui, T., Takisawa, H., 2000. Central role for cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 5, 439–452.
- Morawska, M., Ulrich, H.D., 2013. An expanded tool kit for the auxin-inducible degron system in budding yeast. *Yeast Chichester Engl.* 30, 341–351. doi:10.1002/yea.2967
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13. doi:10.1042/BJ20081386
- Nakamura, J., Walker, V.E., Upton, P.B., Chiang, S.Y., Kow, Y.W., Swenberg, J.A., 1998. Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Res.* 58, 222–225.
- Nakatsu, Y., Asahina, H., Citterio, E., Rademakers, S., Vermeulen, W., Kamiuchi, S., Yeo, J.-P., Khaw, M.-C., Saijo, M., Kodo, N., Matsuda, T., Hoeijmakers, J.H.J., Tanaka, K., 2000.

XAB2, a Novel Tetratricopeptide Repeat Protein Involved in Transcription-coupled DNA Repair and Transcription. *J. Biol. Chem.* 275, 34931–34937. doi:10.1074/jbc.M004936200

Neecke, H., Lucchini, G., Longhese, M.P., 1999. Cell cycle progression in the presence of irreparable DNA damage is controlled by a Mec1- and Rad53-dependent checkpoint in budding yeast. *EMBO J.* 18, 4485–4497. doi:10.1093/emboj/18.16.4485

Niu, W., Li, Z., Zhan, W., Iyer, V.R., Marcotte, E.M., 2008. Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet.* 4, e1000120. doi:10.1371/journal.pgen.1000120

O'Donovan, A., Davies, A.A., Moggs, J.G., West, S.C., Wood, R.D., 1994. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature* 371, 432–435. doi:10.1038/371432a0

Palzkill, T.G., Newlon, C.S., 1988. A yeast replication origin consists of multiple copies of a small conserved sequence. *Cell* 53, 441–450.

Park, C.H., Sancar, A., 1994. Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 5017–5021.

Park, M.S., Ludwig, D.L., Stigger, E., Lee, S.H., 1996. Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 271, 18996–19000.

Parplys, A.C., Petermann, E., Petersen, C., Dikomey, E., Borgmann, K., 2012. DNA damage by X-rays and their impact on replication processes. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 102, 466–471. doi:10.1016/j.radonc.2012.01.005

Parrilla-Castellar, E.R., Arlander, S.J.H., Karnitz, L., 2004. Dial 9–1–1 for DNA damage: the Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp complex. *DNA Repair, BRIDGE OVER BROKEN ENDS - The Cellular Response to DNA Breaks in Health and Disease* 3, 1009–1014. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.032

Patrick, S.M., Turchi, J.J., 2002. Xeroderma pigmentosum complementation group A protein (XPA) modulates RPA-DNA interactions via enhanced complex stability and inhibition of strand separation activity. *J. Biol. Chem.* 277, 16096–16101. doi:10.1074/jbc.M200816200

Paul-Konietzko, K., Thomale, J., Arakawa, H., Iliakis, G., 2015. DNA Ligases I and III Support Nucleotide Excision Repair in DT40 Cells with Similar Efficiency. *Photochem. Photobiol.* doi:10.1111/php.12487

Pelliccioli, A., Lucca, C., Liberi, G., Marini, F., Lopes, M., Plevani, P., Romano, A., Di Fiore, P.P., Foiani, M., 1999. Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J.* 18, 6561–6572. doi:10.1093/emboj/18.22.6561

Pettijohn, D.E., Hanawalt, P.C., 1963. Deoxyribonucleic acid replication in bacteria following ultraviolet irradiation. *Biochim. Biophys. Acta* 72, 127–129.

Povirk, L.F., Shuker, D.E., 1994. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutat. Res.* 318, 205–226.

Pramila, T., Miles, S., GuhaThakurta, D., Jemiolo, D., Breeden, L.L., 2002. Conserved homeodomain proteins interact with MADS box protein Mcm1 to restrict ECB-dependent transcription to the M/G1 phase of the cell cycle. *Genes Dev.* 16, 3034–3045. doi:10.1101/gad.1034302

Puddu, F., Granata, M., Di Nola, L., Balestrini, A., Piergiovanni, G., Lazzaro, F., Giannattasio, M., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., 2008. Phosphorylation of the Budding Yeast 9-1-1 Complex Is Required for Dpb11 Function in the Full Activation of the UV-Induced DNA Damage Checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4782–4793. doi:10.1128/MCB.00330-08

Rastogi, R.P., Richa, null, Kumar, A., Tyagi, M.B., Sinha, R.P., 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J. Nucleic Acids* 2010, 592980. doi:10.4061/2010/592980

Rialland, M., Sola, F., Santocanale, C., 2002. Essential role of human CDT1 in DNA replication and chromatin licensing. *J. Cell Sci.* 115, 1435–1440.

Richardson, C., Jasin, M., 2000. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* 405, 697–700. doi:10.1038/35015097

Saijo, M., 2013. The role of Cockayne syndrome group A (CSA) protein in transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mech. Ageing Dev.* 134, 196–201. doi:10.1016/j.mad.2013.03.008

Sale, J.E., Lehmann, A.R., Woodgate, R., 2012. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 141–152. doi:10.1038/nrm3289

- Sanchez, Y., Desany, B.A., Jones, W.J., Liu, Q., Wang, B., Elledge, S.J., 1996. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* 271, 357–360.
- Schneider, J., Bajwa, P., Johnson, F.C., Bhaumik, S.R., Shilatifard, A., 2006. Rtt109 Is Required for Proper H3K56 Acetylation A CHROMATIN MARK ASSOCIATED WITH THE ELONGATING RNA POLYMERASE II. *J. Biol. Chem.* 281, 37270–37274. doi:10.1074/jbc.C600265200
- Schreier, W.J., Gilch, P., Zinth, W., 2015. Early events of DNA photodamage. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 66, 497–519. doi:10.1146/annurev-physchem-040214-121821
- Schwertman, P., Lagarou, A., Dekkers, D.H.W., Raams, A., van der Hoek, A.C., Laffeber, C., Hoeijmakers, J.H.J., Demmers, J.A.A., Fousteri, M., Vermeulen, W., Marteijn, J.A., 2012. UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. *Nat. Genet.* 44, 598–602. doi:10.1038/ng.2230
- Schwertman, P., Vermeulen, W., Marteijn, J.A., 2013. UVSSA and USP7, a new couple in transcription-coupled DNA repair. *Chromosoma* 122, 275–284. doi:10.1007/s00412-013-0420-2
- Setlow, R.B., Carrier, W.L., 1964. THE DISAPPEARANCE OF THYMINE DIMERS FROM DNA: AN ERROR-CORRECTING MECHANISM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51, 226–231.
- Shechter, D., Costanzo, V., Gautier, J., 2004. Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair* 3, 901–908. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.020
- Sherr, C.J., 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551–555.
- Sinha, R.P., Häder, D.P., 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 1, 225–236.
- Smith, E., Kiss, F., Porter, R.M., Anstey, A.V., 2012. A review of UVA-mediated photosensitivity disorders. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 11, 199–206. doi:10.1039/c1pp05191a
- Snyder, R.D., Ewing, D., Hendry, L.B., 2006. DNA intercalative potential of marketed drugs testing positive in in vitro cytogenetics assays. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 609, 47–59. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.06.001

Speck, C., Stillman, B., 2007. Cdc6 ATPase activity regulates ORC x Cdc6 stability and the selection of specific DNA sequences as origins of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 282, 11705–11714. doi:10.1074/jbc.M700399200

Stefanini, M., 2000. Trichothiodystrophy: A Disorder Highlighting the Crosstalk between DNA Repair and Transcription.

Stern, L.L., Mason, J.B., Selhub, J., Choi, S.-W., 2000. Genomic DNA Hypomethylation, a Characteristic of Most Cancers, Is Present in Peripheral Leukocytes of Individuals Who Are Homozygous for the C677T Polymorphism in the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 849–853.

Stiff, T., Walker, S.A., Cerosaletti, K., Goodarzi, A.A., Petermann, E., Concannon, P., O’Driscoll, M., Jeggo, P.A., 2006. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J.* 25, 5775–5782. doi:10.1038/sj.emboj.7601446

Strauss, B.S., 2002. The “A” rule revisited: polymerases as determinants of mutational specificity. *DNA Repair* 1, 125–135.

Takayama, Y., Kamimura, Y., Okawa, M., Muramatsu, S., Sugino, A., Araki, H., 2003. GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Genes Dev.* 17, 1153–1165. doi:10.1101/gad.1065903

Tanaka, S., Tak, Y.-S., Araki, H., 2007. The role of CDK in the initiation step of DNA replication in eukaryotes. *Cell Div.* 2, 16. doi:10.1186/1747-1028-2-16

Taschner, M., Harreman, M., Teng, Y., Gill, H., Anindya, R., Maslen, S.L., Skehel, J.M., Waters, R., Svejstrup, J.Q., 2010. A role for checkpoint kinase-dependent Rad26 phosphorylation in transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 30, 436–446. doi:10.1128/MCB.00822-09

Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., Lukas, J., 2013. ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* 155, 1088–1103. doi:10.1016/j.cell.2013.10.043

Toyn, J.H., Johnson, A.L., Donovan, J.D., Toone, W.M., Johnston, L.H., 1997. The Swi5 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase. *Genetics* 145, 85–96.

Tsaalbi-Shtylik, A., Moser, J., Mullenders, L.H.F., Jansen, J.G., de Wind, N., 2014. Persistently stalled replication forks inhibit nucleotide excision repair in trans by sequestering Replication protein A. *Nucleic Acids Res.* 42, 4406–4413. doi:10.1093/nar/gkt1412

Tye, B.K., 1999. MCM proteins in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 649–686. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.649

Vasquez, K.M., Christensen, J., Li, L., Finch, R.A., Glazer, P.M., 2002. Human XPA and RPA DNA repair proteins participate in specific recognition of triplex-induced helical distortions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5848–5853. doi:10.1073/pnas.082193799

Venema, J., Mullenders, L.H., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A., Mayne, L.V., 1990. The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4707–4711.

Waters, L.S., Minesinger, B.K., Wiltrot, M.E., D’Souza, S., Woodruff, R.V., Walker, G.C., 2009. Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 73, 134–154. doi:10.1128/MMBR.00034-08

Waters, T.R., Swann, P.F., 2000. Thymine-DNA glycosylase and G to A transition mutations at CpG sites. *Mutat. Res.* 462, 137–147.

West, T.P., 2000. Role of cytosine deaminase and beta-alanine-pyruvate transaminase in pyrimidine base catabolism by *Burkholderia cepacia*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77, 1–5.

Wold, M.S., 1997. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 61–92. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.61

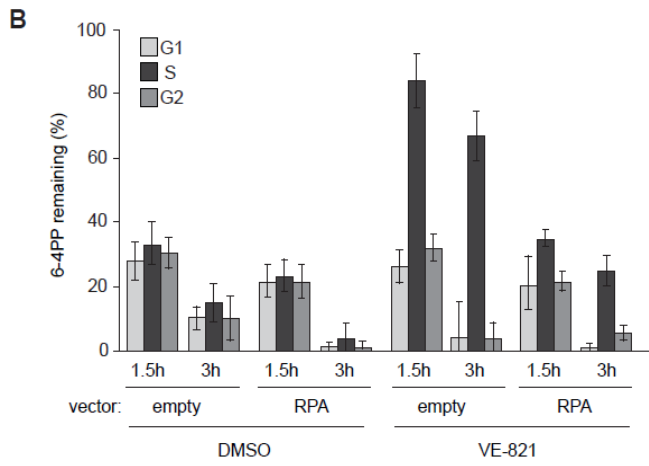
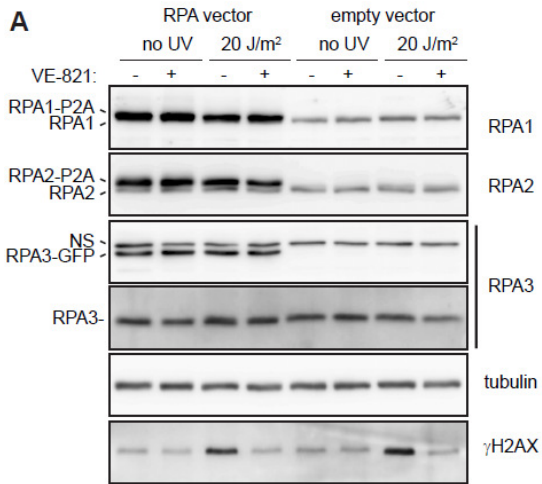
Woodward, A.M., Göhler, T., Luciani, M.G., Oehlmann, M., Ge, X., Gartner, A., Jackson, D.A., Blow, J.J., 2006. Excess Mcm2–7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J. Cell Biol.* 173, 673–683. doi:10.1083/jcb.200602108

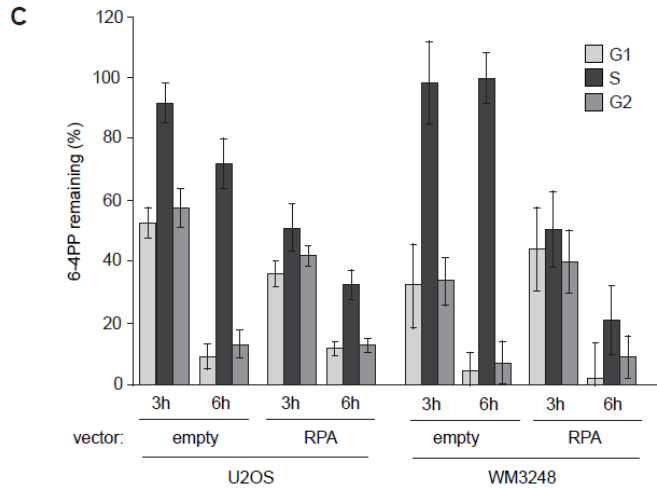
Wurtele, H., Kaiser, G.S., Bacal, J., St-Hilaire, E., Lee, E.-H., Tsao, S., Dorn, J., Maddox, P., Lisby, M., Pasero, P., Verreault, A., 2012. Histone H3 lysine 56 acetylation and the response to DNA replication fork damage. *Mol. Cell. Biol.* 32, 154–172. doi:10.1128/MCB.05415-11

Yekezare, M., Gómez-González, B., Diffley, J.F.X., 2013. Controlling DNA replication origins in response to DNA damage – inhibit globally, activate locally. *J Cell Sci* 126, 1297–1306. doi:10.1242/jcs.096701

- Zhang, X., Horibata, K., Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, S., Tahara, H., Neilan, E.G., Honma, M., Nohmi, T., Yasui, A., Tanaka, K., 2012. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nat. Genet.* 44, 593–597. doi:10.1038/ng.2228
- Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L., Rothstein, R., 2001. The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J.* 20, 3544–3553. doi:10.1093/emboj/20.13.3544
- Zhou, W., Doetsch, P.W., 1993. Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 6601–6605.
- Zhu, G., Spellman, P.T., Volpe, T., Brown, P.O., Botstein, D., Davis, T.N., Futcher, B., 2000. Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature* 406, 90–94. doi:10.1038/35017581
- Zou, L., Stillman, B., 2000. Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3086–3096.

Annexe 1





Annexe 1. Le défaut de NER spécifique à la phase S est éliminé suite à la surexpression de RPA dans des cellules humaines. A-B. Des cellules Hela ont été prétraitées avec l'inhibiteur d'ATR VE-821 et irradiées avec 20J/m² d'UV. **A.** Surexpression de chacune des sous-unités de RPA en utilisant un plasmide polycistronique et comparaison avec un vecteur contrôle vide GFP. Extraction des protéines totales puis analyse immunoblot des quantités de protéines en utilisant un anticorps spécifique à chacune des sous-unités. Les protéines RPA1 et RPA2 surexprimées possèdent un poids moléculaire légèrement supérieur aux protéines endogènes à cause de leur site de clivage. RPA3 possède un marqueur GFP. **B.** Quantification de l'élimination des dommages à l'ADN induit par les UV en fonction du cycle cellulaire en présence ou en absence de l'inhibiteur et avec ou sans surexpression des RPA. **C.** Quantification de l'élimination des dommages à l'ADN induit par les UV en fonction du cycle cellulaire pour des cellules U2OS d'ostéosarcome ou WM3248 de mélanome en présence ou en absence de surexpression des sous-unités de RPA.

Annexe 2 - Table des souches de levures

Nom	Génotype	Source
HWY 294	BY4743 MATa ura3Δ0 his3Δ1	Cette étude
ICY 703	FY MATa his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 ura3-52 hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1	Celic, I., (2006)
YJT75	W303 Mata trp1-1 ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 sml1Δ::URA3 rad53Δ::LEU2	Gunjan, A., Verrault A. (2003)
U953-61A	W303 MATa trp1-1 ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3	R. Rothstein
HWY 1668	W303 MATa ura3-52 trp1Δ2 leu2-3,112 his3-11 ade2-1 can1-100	GE Healthcare
YKB2	W303-1a MATa trp1-1 ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 cdc7-4	Bousset, K., (1998)
HWY 2917	W303-1a MATa trp1-1 ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 cdc7-4 mec1Δ::KANMX sml1Δ::HPHMX	Cette étude
YNK54	W303-1a MATa ura3-1::ADH1-OsTIR1-9xMyc::URA3 ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,115 trp1-1 (psi+) RAD5-535	Nishimura et al. [2009]
JPY1973	BY4741 MATa bar1Δ::hphMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY1974	BY4741 MATa bar1Δ::hphMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY1976	BY4741 MATa bar1Δ::hphMX mec1Δ::hphMX sml1Δ::kanMX Leu- ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY1988	BY4741 MATa Rad16Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY1989	BY4741 MATa Rad26Δ::URA3MX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY1996	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY1998	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX mec1Δ::hphMX sml1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2000	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX rtt109Δ::URA3MX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2011	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX ctf4Δ::URA3MX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2012	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX mms2Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2013	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX mms1Δ::URA3MX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2014	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX dia2Δ::URA3MX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2015	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX rad52Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2016	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX mms22Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2017	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX elg1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2018	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX sgs1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2019	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX siz1Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2020	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX esc2Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2021	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX rad26Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude

JPY2022	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX rad50Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2023	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX rad51Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2024	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX rad54Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2025	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX rad5Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2026	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX rad6Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2027	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX rad18Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2028	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX rad30Δ::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2029	BY4741 MATa RFA1-GFP::HIS3MX rtt101Δ::URA3MX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2032	W303-1a MATa RFA1-AID-9Myc::Natmx ade2-1can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1::ADH1-OsTIR1-9xMyc::URA3 [psi+] RAD5-535	Cette étude
JPY2033	W303-1a MATa RFA1-AID-Flag::HPHmx ade2-1can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1::ADH1-OsTIR1-9xMyc::URA3 [psi+] RAD5-535	Cette étude
JPY2036	BY4741 MATa RFA1-9Myc::HPHmx ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2040	BY4741 MATa [pGal-RFA1-HA-PrA URA3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2041	BY4741 MATa [pGal-RFA2-HA-PrA URA3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2042	BY4741 MATa [pGal-RFA3-HA-PrA URA3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2043	BY4741 MATa [pGal-RFA1-HA-PrA HIS3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2044	BY4741 MATa [pGal-RFA2-HA-PrA HIS3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2045	BY4741 MATa [pGal-RFA3-HA-PrA HIS3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2046	BY4741 MATa [pGal-RFA1-HA-PrA LEU2] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2047	BY4741 MATa [pGal-RFA2-HA-PrA LEU2] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY2048	BY4741 MATa [pGal-RFA3-HA-PrA LEU2] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY3305	BY4741 MATa [pGal-RFA1-HA-PrA URA3MX] [pGal-RFA3-HA-PrA LEU2] [pGal-RFA1-HA-PrA HIS3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY3307	BY4741 MATa mec1Δ::hphMX sml1d::kanMX [pGal-RFA1-HA-PrA URA3MX] [pGal-RFA3-HA-PrA LEU2] [pGal-RFA1-HA-PrA HIS3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY3308	BY4741 MATa rtt109Δ::kanMX [pGal-RFA1-HA-PrA URA3MX] [pGal-RFA3-HA-PrA LEU2] [pGal-RFA1-HA-PrA HIS3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY3309	BY4741 MATa rad52Δ::kanMX [pGal-RFA1-HA-PrA URA3MX] [pGal-RFA3-HA-PrA LEU2] [pGal-RFA1-HA-PrA HIS3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY3310	BY4741 MATa rad6Δ::kanMX [pGal-RFA1-HA-PrA URA3MX] [pGal-RFA3-HA-PrA LEU2] [pGal-RFA1-HA-PrA HIS3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY3311	BY4741 MATa dia2Δ::kanMX [pGal-RFA1-HA-PrA URA3MX] [pGal-RFA3-HA-PrA LEU2] [pGal-RFA1-HA-PrA HIS3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY3312	BY4741 MATa [pYES2-URA3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY3313	BY4741 MATa [pYES2-LEU2] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude
JPY3314	BY4741 MATa [pYES2-HIS3MX] ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1	Cette étude

JPY3315	BY4741 MATa RFA1-V5-His::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0	v5 collection
JPY3316	BY4741 MATa RFA2-V5-His::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0	v5 collection
JPY3317	BY4741 MATa RFA3-V5-His::kanMX ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0	v5 collection

