

Université de Sherbrooke

Relations entre la structure de la chromatine et la transcription dans les gènes ribosomiaux pendant la réparation par excision de nucléotides (NER) dans différents mutants de délétion *rad* chez *S.cerevisiae*

Par

Michel Paquette

Microbiologie et infectiologie

Mémoire présenté à la faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie et infectiologie

28 Avril 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-26030-2
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-26030-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

Liste des figures	iv.
Liste des tableaux	v.
Liste des abbréviations	vi.
Résumé	
1. Introduction	1
1.1. La NER	1
1.2. La chromatine	6
1.3. La NER dans la chromatine	8
1.4. Chromatine des gènes ribosomaux	10
1.5. NER dans la chromatine ribosomale	14
1.6. Le problème <i>rad4</i>	16
2. Matériel et méthodes	19
2.1. Création des mutants de délétion <i>rad1Δ</i> , <i>rad4Δ</i> et <i>rad14Δ</i>	19
2.2. Décompte de colonies sur pétri suite à une irradiation de différentes doses d'UV	21
2.3. Irradiation de cellules aux UV et réparation	22
2.4. Préparation de noyaux de levures	22
2.5. Photo-pontage de noyaux au psoralène	25

2.6.	Digestion de noyaux par EcoRI	25
2.7.	Essai T4-Endonucléase V, ADNr total	26
2.8.	Essai T4 Endonucléase V, séparation de l'ADNr actif et Inactif	27
2.9.	Vérification de la séparation de l'actif et de l'inactif par psoralène	29
2.10.	Essai d'élongation de transcription sur noyaux (TRO)	29
3.	Résultats	31
3.1.	La digestion de noyaux par EcoRI libère la fraction active; la digestion par NheI de l'ADN isole la fraction inactive	31
3.2.	La NER est plus efficace dans la fraction active des gènes ribosomiaux que dans la fraction inactive	33
3.3.	L'assemblage de la chromatine suite à une irradiation UV est indépendant de la NER	36
3.4.	L'inhibition de l'élongation de l'ARN pol. I par les UV corrèle avec l'assemblage de la chromatine; la reprise de transcription correspond au désassemblage de la chromatine et à la réparation des CPD	41
3.5.	La diminution d'élongation de la transcription dans des cellules non irradiées ne provoque pas de changements majeurs dans la chromatine des ADNr	44

3.6.	Le mutant <i>rad4Δ</i> répare 60% du brin transcrit des ADNr, malgré qu'il est phénotypiquement très sensible aux UV	48
3.7.	Le brin transcrit de la fraction active des ADNr est mieux réparé que la fraction inactive des gènes ribosomiaux chez <i>rad4Δ</i>	53
3.8.	La chromatine récupère plus rapidement son état initial chez <i>rad4Δ</i> que chez le type sauvage pendant la NER	56
3.9.	Malgré un retour rapide à deux populations d'ADNr et une réparation normale des CPD du TS des gènes actifs, la transcription ne reprend pas après une irradiation aux UV chez <i>rad4Δ</i>	58
4.	Discussion	62
5.	Conclusion	70
6.	Remerciements	72
7.	Bibliographie	74

Liste des tableaux

Tableau 1 : Souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* utilisées 20

Liste des abréviations

ADN = Acide désoxyribonucléique

ADN pol. = ADN polymérase

ADNr = ADN ribosomale

ARN = Acide ribonucléique

ARN pol. = ARN polymérase

ARNr = ARN ribosomale

ARR = Accéder/Réparer/Rétablir

ATP = Adénosine triphosphate

BER = « Base excision repair » ; réparation par excision de bases

CAF1 = « Chromatin assembly factor 1 »

CPD = « Cyclobutane pyrimidine dimer » ; dimère de cyclobutane pyrimidine

CTP = Cytosine triphosphate

DMF = Diméthylformamide

E = Phase Exponentielle de croissance

EDTA = Acide éthylène diamine tétra-acétique

ES = Phase début de stationnaire de croissance

GGR = « Global genome repair » ; réparation globale du génome

GTP = Guanosine triphosphate

HR = « Homologous recombination » ; Recombinaison homologue

J/m² = Joule/mètre carré

mm = Millimètre

MOPS = « Morpholinopropanesulfonic acid »
; Acide morpholinopropanesulfonique

NER = « Nucleotide excision repair » ; réparation par excision de nucléotides

NTS = « Non-transcribed strand » ; Brin non transcrit

OD = « Optical Density » ; Densité optique

PBS = « Phosphate buffer saline » ; Tampon saline au phosphate

PCR = « Polymerase chain reaction » ; Réaction de polymérase en chaîne

RBF = « Replication fork barrier »

S = Phase Stationnaire de croissance

TCR = « Transcription-coupled repair » ; réparation couplée à la transcription

TFIIH = Transcription factor IIH » ; Facteur de transcription II

TRO = « Transcription run-on » ; Essai d'élongation de la transcription *in vitro*

TS = « Transcribed strand » ; Brin transcrit

T4 endo V = T4 = T4 endonucléase V

UTP = Uridine triphosphate

³²P-αUTP = Uridine triphosphate α-phosphate ³²

UV = Ultraviolet, lumière ultraviolette

YPD = YEPD = « Yeast extract/peptone/dextrose »

6-4 PD = Dimère de 6-4 pyrimidine-pyrimidone

Résumé

Des remaniements de la chromatine se produisent pendant la réparation de dimères de cyclobutane pyrimidine par la réparation par excision de nucléotide (NER). Par la suite, la structure de départ doit être rétablie pour conserver des fonctions génomiques normales. Le fonctionnement de la NER sur la chromatine non-nucléosomale et les mécanismes rétablissant la chromatine suite à la NER sont inconnus. L'analyse de la NER dans les gènes ribosomiaux (ADNr), présents en plusieurs copies dont seulement une fraction est activement transcrite et non-nucléosomale, nous a permis de montrer que la réparation de CPD est rapide dans l'ADNr actif et que des réarrangements chromatiniens se produisent pendant la NER. De plus, la chromatine s'assemble sur l'ADNr non-nucléosomal durant les premiers événements de la NER, mais en absence de réparation. La reprise de la transcription suite à la réparation des CPD concide avec la réapparition de chromatine non-nucléosomale. Jusqu'à maintenant, seulement le passage de la machinerie de réplication était connu pour empaqueter *de novo* les ADNr dans des nucléosomes. Ainsi, peu après la formation de dommages UV sur l'ADN, il y a assemblage de chromatine.

Aussi, la protéine Rad4, quoique essentielle à la NER, n'est pas encore bien caractérisée; sa fonction exacte n'est pas encore identifiée. Ainsi, il est connu que la délétion de celle-ci entraîne une forte sensibilité aux UV et

une incapacité de réparer des dimères dans les gènes ARN polymérase II et les régions non transcrites du génome. Or, malgré l'absence de réparation du brin non transcrit des gènes ribosomiaux (ARN pol. I), le brin transcrit est quant à lui réparé à 50-60%. Dans le but de mieux caractériser Rad4, nous avons étudié plus en détail la réparation NER des gènes ribosomiaux en séparant la fraction active non nucléosomale de la fraction inactive nucléosomale. La réparation est normale dans le brin transcrit de la fraction active, alors que le brin non transcrit de la fraction active et les deux brins de la fraction inactive des ADNr sont moins bien réparés. En parallèle, il y a aussi assemblage de nucléosomes sur les parties actives peu après l'irradiation chez *rad4Δ*, mais contrairement aux autres mutants NER étudiés, il y a retour d'une chromatine non nucléosomale. De plus, ce désassemblage se produit plus rapidement que chez le type sauvage. Malgré ces faits, la transcription ne se rétablit pas dans cette souche.

1. Introduction

1.1. La NER

Une multitude d'agents et de facteurs sont capables de causer divers dommages à l'ADN, tous inhibant différents processus cellulaires tels que la transcription et la réplication tout en étant source de mutation. Il est donc d'importance capitale pour les cellules vivantes de réparer ces lésions pour ainsi maintenir leurs fonctions et leur génome intactes. En particulier, les rayons ultraviolets (de longueur d'onde entre 200 et 400nm) sont une source importante de dommages exogènes, puisque le soleil en est une source continue et que l'on y est exposé fréquemment. Les UV peuvent se diviser en 3 principales catégories, soit les UV-C (de 200 à 280nm), les UV-B (de 280 à 320nm) et les UV-A, dont la longueur d'onde est de 320 à 400nm (PFEIFER *et al.*, 2005). Les UV-A causent leurs dommages à l'ADN principalement par la formation de radicaux libres lorsqu'ils sont absorbés par l'eau (PFEIFER *et al.*, 2005). De leur côté, les UV-C peuvent être absorbés directement par l'ADN et formeront ainsi principalement des dimères de cyclobutane pyrimidine (CPD : contribuent pour environ 70%) et des dimères 6-4 pyrimidine-pyrimidone (6-4 PD : contribuent pour environ 25%) (PFEIFER *et al.*, 2005). Les UV-B, quant à eux, sont source de dommages autant par formation de dimères que par création de radicaux libres.

Les CPD se forment lorsque deux pyrimidines adjacentes, au moment qu'un rayon UVB ou UVC est absorbé par l'ADN, sont dans une conformation telle que les bases sont parallèles entre elles. De cette façon, les liaisons doubles entre les carbones 5 et 6 de chaque base réagiront pour former un cycle à quatre carbones (un cyclobutane) reliant les deux carbones 5 entre eux, ainsi que les deux carbones 6 (SETLOW et CARRIER, 1966). La rigidité structurale induite par un CPD provoque une torsion de 9° dans l'ADN (KIM *et al*, 1995). Quant aux 6-4 PD, leur formation se produit lorsque deux pyrimidines adjacentes sont dans une conformation permettant une liaison simple entre le carbone 6 d'une base et le carbone 4 de l'autre base lors d'une irradiation UVB ou UVC (RYCYNA et ALDERFER, 1985). Un 6-4 PD déforme l'ADN de façon plus prononcée qu'un CPD : l'angle induit par ce dommage est de 44° (KIM *et al*, 1995).

Si les dommages radicalaires sont surtout réparés par une voie appelée BER (pour « Base Excision Repair »), le rétablissement des dimères de pyrimidine (autant les CPD que les 6-4 PD) dépendent de la NER (pour « Nucleotide Excision Repair »). En fait, tout dommage induisant à la fois une torsion et un changement chimique dans l'ADN sont généralement traités par la NER (BUSCHTA-HEDAYAT, 1999). La NER se divise en 4 grandes étapes, soit la reconnaissance du dommage, l'incision en 3' et en 5' du dommage, l'excision de l'oligonucléotide contenant le dommage, et finalement la synthèse/ligation de l'espace simple brin formé.

Chez les eucaryotes, la voie de la NER est bien conservée de la levure (*S.cerevisiae*) à l'homme. D'abord, chez l'Homme, les protéines du groupe de complémentarité XP (XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF et XPG), ainsi que les protéines ERCC1, RPA et hHR23B sont toutes impliquées dans la reconnaissance et le retrait de dommages par la NER (ARAUJO et WOOD, 1999). Un défaut d'une des protéines XP chez l'Homme cause une maladie génétique appelé *Xéoderma pigmentosum*, caractérisé par une sensibilité au soleil et une augmentation marquée de l'incidence du cancer de la peau. En premier lieu, le complexe XPC/hHR23B (si un dommage se produit sur un brin non-transcrit, GGR; SUGASAWA *et al*, 1998) ou une ARN polymérase II bloqué à un dommage (dans le cas où un dommage est sur un brin transcrit, TCR; SELBY *et al*, 1997) sert de reconnaissance du dommage par la NER. Par la suite, l'ADN est ouverte (les brins sont séparés) autour du dommage de manière ATP-dépendante par le complexe de transcription TFIIH, contenant les hélicases XPB (3' vers 5') et XPD (5' vers 3') (EVANS *et al*, 1997). Cette étape dépend aussi de la présence de XPA et de RPA (WASASUGI et SANCAR, 1998). Cette ouverture forme une bulle de 24 à 32 nucléotides de long où l'ADN est simple brin, ce qui permet aux endonucléases XPG (incision 3') et ERCC1/XPF (incision 5') de couper près des jonctions entre l'ADN double et simple brin (EVANS *et al*, 1997). Ainsi, un oligonucléotide de 24 à 32 nucléotides de long sera relâché (excisé) (MOGGS *et al*, 1996). Enfin, cette brèche sera comblée par l'ADN

polymérase δ ou ϵ , aidé par les facteurs de réplication RPA, PCNA et RFC, puis il y aura ligation par l'ADN ligase I (WOOD et SHIVJI, 1997).

Chez la levure, près d'une trentaine de protéines sont impliquées dans le processus de la NER. Les gènes RAD1, RAD2, RAD3, RAD4, RAD10, RAD14 et RAD25 font partie de la classe 1; leur délétion entraîne une très grande sensibilité aux UV (PRAKASH et PRAKASH, 2000). Quant à eux, les gènes RAD7, RAD16, RAD23 et MMS19 sont de classe 2 et entraîne une sensibilité aux UV modérée chez des mutants de délétion correspondants (PRAKASH et PRAKASH, 2000). Toutes ces protéines, excepté Rad7 et Rad16, ont un homologue humain. De plus, la levure est un outil plus facile à manipuler et mieux caractérisé que la cellule de mammifère, ce qui justifie son choix pour effectuer nos expériences.

Tout comme chez l'Homme, deux différents modes de détection des dommages sont présent dans la levure. D'abord, lors de la réparation de régions non-transcrites du génome, ainsi que sur le brin non-transcrit des gènes en transcription (GGR : « Global Genome Repair »), la reconnaissance du dommage est attribuée à la protéine Rad14 (GUZDER *et al.*, 1996), l'homologue de XPA. Le complexe Rad4-Rad23 (homologues de XPC et hHR23B) a aussi de l'affinité pour les dommages UV à l'ADN, mais son rôle reste à préciser (GUZDER *et al.*, Nov.1998). Le complexe Rad7-Rad16 (n'ayant aucun homologue humain) s'attache aux dommages de manière

ATP-dépendante: ce hétérodimère parcourt l'ADN double brin jusqu'à un dommage (GUDZER *et al*, Mar. 1998). Le complexe TFIIH, dont 2 de ses 6 sous-unités sont les hélicases Rad3 (5' vers 3', homologue de XPD) et Rad25 (3' vers 5', homologue de XPB), permet ensuite l'ouverture des deux brins de l'ADN au site du dommage (SUNG *et al*, 1996). Cet événement permettra aux protéines Rad1-Rad10 (homologues de XPF et ERCC1) d'effectuer une incision simple brin en 3' du dommage et à Rad2 (homologue de XPG) de faire une coupure simple brin en 5' du dommage (BARDWELL *et al*, 1994; HABRAKEN *et al*, 1993). Suivant l'excision de l'oligonucléotide de 24 à 30nt de long (portant le dommage), l'ADN polymérase II synthétisera la portion manquante, puis l'ADN ligase I liera finalement les extrémités OH et phosphate libres (PRAKASH et PRAKASH, 2000).

. Ensuite, une autre variante de la NER, appelée TCR (pour « Transcription Coupled Repair ») se produit lorsque le dommage est situé sur le brin transcrit (TS : « transcribed strand ») d'un gène activement transcrit. La TCR est un processus réparant l'ADN plus rapidement que la GGR (MELLON *et al*, 1986). Des études sur des cellules de mammifère indiquent que l'arrêt d'une ARN polymérase II au site d'un dommage, puis son remplacement par la protéine CSB, serait le signal de reconnaissance dans la voie de la TCR (CITTERIO *et al*, 2000). Ainsi, la délétion de Rad26, l'homologue de CSB dans *S.cerevisiae*, est impliquée dans la TCR des gènes polymérase II puisque sa délétion entraîne une déficience en TCR (van

GOOL *et al*, 1994). Aussi, la surexpression de Rad26 augmente autant la TCR que la GGR, suggérant que cette protéine permet une meilleure accessibilité des dommages dans la chromatine (BUCHELI et SWEDER, 2004). Or, la TCR a été observé également dans les gènes ARN polymérase I (CONCONI *et al*, 2002), et un homologue récemment découvert de Rad4, YDR314C, serait responsable de la réparation du brin transcrit du mutant *rad4Δ*, suggérant un rôle de cette nouvelle protéine dans la TCR, un peu comme Rad26 dans les gènes ARN polymérase II (den DULK *et al*, 2005). Finalement, les autres étapes de réparation de la TCR sont pareilles à celles de la GGR; seule l'étape de reconnaissance diffère.

1.2. Chromatine

Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine et est constitué d'ADN enroulant sur 146pb un octamère d'histone (deux sous-unités de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4) chargé positivement (LUGER, 2003). L'histone H1, quant à elle, se retrouve dans les « linker » (formé d'ADN nue) entre les nucléosomes et contribue à l'empaquetage de l'ADN en filaments de chromatine de 10nm (en chapelets) et en fibre de 30nm de diamètre (THOMA, 1999). Ces fibres sont compactées davantage *in vivo* pour former les fibres de chromosomes en interphase de 100 à 400nm de diamètre (WOODCOCK et DIMITROV, 2001). Or, cette structure change

d'état de façon dynamique à travers divers processus tels que la réplication, la recombinaison, la transcription et la réparation de l'ADN, et ces phénomènes sont habituellement inhibés par la présence de chromatine. Or, des réarrangements localisés de chromatine peuvent survenir en réponse à des signaux cellulaires et sont orchestrés par au moins 2 catégories de mécanismes. Premièrement, un mécanisme permet le remodelage des nucléosomes ATP-dépendant effectués par les protéines de la superfamille Swi2 (LANGST et BECKER, 2004). Deuxièmement, des protéines peuvent modifier les queues N-terminal des histones en y ajoutant de façon covalente diverses molécules, incluant des acétyl, des méthyl, des phosphates et de l'ubiquitine (JENUWEIN et ALLIS, 2001).

Aussi, la composition en chromatine du génome est hétérogène selon le contenu et la fonction des séquences observées. Il existe deux principales structures de chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine. Les domaines euchromatiniens sont répliqués tôt dans la phase S d'une cellule, tandis que les domaines hétérochromatiniens ont une réplication tardive (HENNING, 1999). Dans l'euchromatine, les histones sont acétylés, les nucléosomes sont altérés ou démontés dans les régions promotrices et le domaine chromatinien est déplié (THOMA, 1999). Aussi, dans les régions codantes, les nucléosomes sont perdus ou réarrangés dans la partie transcrite et des ARN polymérases en transcription sont placés le long du

gène (THOMA, 1999). D'un autre côté, une fraction des gènes inactivés et les régions non codantes portent de l'hétérochromatine hautement condensée résultant de modifications épigénétiques (GRUNSTEIN, 1998). Ainsi, l'hétérochromatine, peu accessible aux agents de modification de l'ADN, est caractérisée par des nucléosomes espacés en intervalles réguliers et formés d'histones hypoacétylés ou méthylés (HENNING, 1999).

1.3. La NER dans la chromatine

La NER, tout comme la réplication et la transcription, est restreinte par la structure de la chromatine (SMERDON et CONCONI, 1999). Peu est connu de la façon dont les protéines de la NER reconnaissent et réparent des dommages situés dans les divers niveaux de structures chromatiniennes, mais plusieurs études pointent vers un remaniement et/ou une modification de cette chromatine pour permettre l'accès à la lésion. En fait, une ensemble d'études ont amené le modèle ARR (Accéder, Réparer, Rétablir) pour expliquer le fonctionnement possible de la NER dans la chromatine (GREEN et ALMOUZNI, 2002). Dans ce modèle, les étapes initiales de la NER permettent un réarrangement de la chromatine, puis la réparation de la lésion sera suivie du rétablissement de la structure initiale de la chromatine (GREEN et ALMOUZNI, 2002). Ainsi, une étude montre une modulation des empreintes DNaseI pendant la synthèse de l'ADN UV-dépendante dans des

cellules de mammifères (SMERDON et LIEBERMAN, 1978). Les résultats obtenus ont montré que les régions sensibles aux nucléases sont celles ayant le plus de synthèse de réparation immédiatement après l'irradiation aux UV (SMERDON et LIEBERMAN, 1978). Plus récemment, il a été montré que le positionnement des nucléosomes dans le promoteur MET17 modulait la NER (POWELL *et al.*, 2003). Une autre étude suggère que l'assemblage de nucléosomes *de novo* couplé à la NER impliquerait la chaperone d'histone CAF1 (MELLO et ALMOUZNI, 2001). La protéine CAF1 est capable de promouvoir l'assemblage *de novo* de nucléosome préférentiellement sur de l'ADN nouvellement synthétisé, soit pendant la réplication (SMITH et STILLMAN, 1989), soit pendant la réparation (GAILLARD *et al.*, 1996). Cette capacité de discrimination entre l'ADN mère et l'ADN fille est due au fait que CAF1 reconnaît l'ADN dont la topologie est modifiée par la présence de PCNA, un facteur de processivité des ADN polymérases (SHIBAHARA et STILLMAN, 1999). Or, si ces études donnent quelques indices sur le fonctionnement de la NER dans la chromatine, peu est connu sur la réparation de domaines actifs et non-nucléosomaux ou sur les réarrangements chromatinien pouvant survenir pendant ou suite à la réparation de tels domaines.

Non seulement la NER est modulée par la structure de la chromatine, mais la formation de dimères de cyclobutane pyrimidine est aussi influencée par la topologie de l'ADN dans la chromatine. Ainsi, des nucléosomes

obtenus par digestion par nucléase de cellules humaines irradiées ont montré une modulation de la distribution des CPD avec une période de 10,3 bases (GALE *et al*, 1987). Le repliement de l'ADN autour des nucléosomes favoriserait la formation de CPD aux endroits où les petits sillons font face vers l'extérieur. Or, le nucléosome ne semble pas directement influencer la répartition des CPD, car une modulation semblable a été observée avec de l'ADN plié en boucle sans nucléosome au centre (PEHRSON et COHEN, 1992). Aucune modulation de ce type n'est observée dans l'ADN reliant deux nucléosomes (PERHSON, 1995) ou dans des nucléosomes « dépliés » (BROWN *et al*, 1993). Pour ce qui est des dimères (6-4) pyrimidine-pyrimidone, il n'y a pas de telle modulation (GALE et SMERDON, 1990), mais ces dommages (et non les CPD) se retrouvent préférentiellement dans l'ADN reliant les nucléosomes (NIGGLI et CERUTTI, 1982).

1.4. Chromatine des gènes ribosomiaux

Dans les gènes ARN polymérase I (ARN pol. I), c'est-à-dire les gènes ribosomiaux, une structure unique de chromatine y est présente. En effet, le locus ribosomale, situé sur le chromosome 12 de la levure, est constitué d'environ 150 répétitions de gènes ribosomiaux de 9,1kb chaque en tandem (PLANTA, 1997). Chaque répétition est formée d'un espace non transcrit et d'un gène (35S) transcrit par la polymérase I (Figure 1). L'espace non

transcrit contient divers éléments, dont le gène 5S (court transcrit de l'ARN polymérase III), une origine de réplication, une barrière de fourche de réplication (RBF) et le promoteur de 35S (SOGO et THOMA, 2003). Des 150 répétitions ribosomales, seulement 40% des gènes ribosomaux sont activement transcrits en phase exponentielle de croissance. Ces gènes sont densément peuplés d'ARN polymérase I en transcription active et sont dénués de nucléosomes canoniques (SOGO et THOMA, 2003). En contrepartie, les 60% restants sont dans un état semblable à l'hétérochromatine, formés de nucléosomes canoniques et denses et où il n'y a pas transcription (SOGO et THOMA, 2003). Les régions actives sont sensibles aux endonucléases de restriction, tandis que les régions inactives résistent à un tel traitement (CONCONI *et al.*, 1989).

Aussi, le photo-pontage au psoralène a grandement aidé à l'élucidation de la structure de la chromatine des gènes ribosomaux dans divers organismes, de la levure aux plantes jusqu'à la souris). Le psoralène est une molécule tricyclique de la famille des furocoumarines pouvant s'intercaler entre les deux hélices de l'ADN de manière non covalente (PARSONS, 1980). Une irradiation aux UV-A est nécessaire suite à l'intercalation pour lier le psoralène à l'ADN de manière covalente; deux doubles liaisons du psoralène réagiront alors avec deux pyrimidines adjacentes et de brin opposé, attachant ainsi les brins d'ADN ensemble (PARSONS, 1980). Aussi, cet ajout a pour conséquence d'alourdir et de rendre moins flexible les

molécules d'ADN, ce qui ralentit la migration de cet ADN sur gel d'agarose en comparaison à un échantillon non affecté (CONCONI *et al*, 1989). Cette dernière propriété permet de distinguer entre les ADNr actifs et inactifs sans perturber la structure de la chromatine (GALE et SMERDON, 1988). Ainsi, l'ADN nucléosomale n'est accessible au psoralène qu'à ADN « linker » (CECH et PARDUE, 1977) : les nucléosomes rendent l'ADN imperméable au psoralène. D'un autre côté, les promoteurs, les origines de réplication, les régions codantes de l'ADNr (LUCCHINI et SOGO, 1998), et les ADN et ARN polymérase (SOGO et THOMA, 2003) sont des structures n'inhibant pas les photo-pontages au psoralène. Ainsi, les gènes ribosomiaux activement transcrits sont plus fortement photo-pontés que les gènes inactifs par le psoralène, ce qui se traduira suite à une digestion de restriction et une électrophorèse sur gel d'agarose par l'apparition de deux bandes distinctes : une plus retardée correspondant aux gènes actifs et l'autre moins retardée représentant les gènes inactifs (CONCONI *et al*, 1989).

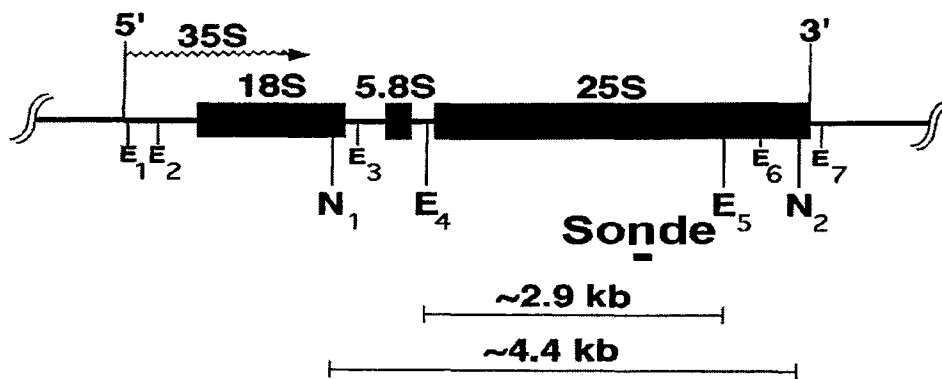


Figure 1 : Structure d'une répétition ribosomale. Le gène ARN polymérase I 35S est un transcrit de 6,6kb dont l'ARN est clivé en composantes du ribosome 18S, 5,8S et 25S. Un espace intergénique non transcrit suit chaque 35S, le tout formant une répétition de gènes ribosomiaux de 9,1kb. Le schéma montre les sites de restriction EcoRI (E) et NheI (N), ainsi que la sonde utilisée pour toutes les expériences (soit une sonde ADN fait par oligonucléotides dégénérés, soit une ribosonde brin-spécifique). Cette sonde révèle donc un fragment EcoRI (E₄-E₅) de 2,9kb et un fragment NheI (N₁-N₂) de 4,4kb.

1.5. NER dans la chromatine ribosomale

La machinerie de réparation NER doit accéder à toute une gamme de structure chromatinienne pour y réparer l'ADN, de gènes activement transcrit à des régions hétérochromatiniennes fortement empaquetées. Ceci suggère qu'il doit y avoir des remaniements ou des modifications de la chromatine qui doivent avoir lieu pour que les réparations se fassent (CONCONI, 2005). Néanmoins, l'étude de la NER dans les différentes structures de la chromatine est compliquée justement par la nature dynamique de celle-ci : l'état actif (ou pré-actif) est seulement transitif, du moins dans les gènes transcrits par l'ARN polymérase II.

Or, dans les ADN ribosomaux, une partie des gènes sont inactivés et compactés par des nucléosomes d'intervalles réguliers, tandis qu'une autre partie des gènes (actifs) sont dénués de nucléosomes canoniques et remplis de ARN polymérase I en transcription (LUCCHINI et SOGO, 1998). Cette structure particulière a été utilisée pour montrer l'existence de la TCR dans les gènes ribosomaux des levures (CONCONI *et al*, 2002). En effet, en utilisant les différences de sensibilité aux enzymes de restriction des gènes actifs et inactifs, ces parties ont pu être séparées, puis la réparation des brins transcrits et non transcrits a pu être suivie dans chacune d'entre elles (CONCONI *et al*, 2002). Le brin transcrit des gènes ribosomaux actifs s'est avéré être réparé plus rapidement que les autres parties (TCR) et les gènes

actifs sont réparés plus rapidement que les gènes inactifs, témoignant de l'encombrement de la chromatine à la NER (CONCONI *et al*, 2002).

Dans le but de mieux caractériser les réarrangements chromatinien pendant la NER, 2 différentes méthodes ont été utilisées sur la chromatine ribosomale, soit le photo-pontage au psoralène et l'accessibilité aux enzymes de restriction sur des noyaux provenant de cellules à différents temps de réparation suivant une dose d'UV-C. Aussi, pour savoir si ces changements sont dus à la présence de la machinerie NER ou aux dommages de manière directe ou indirecte, nous avons également utilisé la souche *rad1Δ*, complètement déficiente en NER. Or, le dimère d'endonucléase dommage-spécifique Rad1-Rad10 semblant également impliqué dans la réparation par excision de base (BER, KARUMBATI *et al.*, 2003) et dans la réparation par recombinaison homologue (HR, VANCE et WILSON, 2002), l'utilisation d'un mutant *rad14Δ* propre à la NER en plus de *rad1Δ* était de mise. En fait, l'absence d'une de ces protéines empêche la formation du complexe NER au site du dommage (PRAKASH et PRAKASH, 2000). Enfin, puisque la transcription est intimement liée à la structure de la chromatine et que des dimères de pyrimidine sur le brin transcrit bloquent la progression d'une ARN polymérase, nous avons étudié l'élongation de la transcription dans chacune de ces souches dans les différents temps de réparation.

1.6. Le problème Rad4

La protéine Rad4 est, tout comme Rad1 et Rad14, une composante de la NER de classe I; son absence entraîne une sensibilité extrême aux UV (PRAKASH et PRAKASH, 2000). Or, nous en avons un portrait incomplet à propos de ses fonctions biochimiques dans la NER. Des études *in vitro* ont montré que Rad4 contribuerait à reconnaître les dommages et que l'attachement du complexe Rad4-Rad23 au site d'un dommage initierait le recrutement des autres protéines de la NER pour compléter la réparation du dommage (GUZDER *et al.*, 1998; DULK *et al.*, 2005). Il y aurait aussi une régulation des niveaux de Rad4 par la voie du protéasome : Rad23, le partenaire de Rad4, interagit avec le protéasome 26S par le biais de son domaine « ubiquitin-like » (SCHAUBER *et al.*, 1998). Ainsi, Rad23 peut contrôler l'ubiquitination de Rad4 et que Rad4 ubiquitiné est dégradé par le protéasome (LOMMEL *et al.*, 2002). Il a même été suggéré qu'ainsi, plusieurs protéines de la NER pourraient être régulées via le protéasome (LOMMEL *et al.*, 2002).

Rad4 a comme homologue de structure humaine la protéine XPC. Cette dernière est considérée comme la responsable de la reconnaissance du dommage dans la GGR; or, on considère que c'est Rad14 (dont l'homologue humain est XPA) qui joue ce rôle chez la levure. Des lignées de cellules *xpc⁻/xpc⁻* provenant de patients souffrant du *xéoderma pigmentosum*

de type III ont une grande sensibilité aux UV et ne sont capables de réparer que le brin transcrit des gènes ARN polymérase II (VERHAGE *et al.*, 1996). En contrepartie, Rad4 (malgré l'homologie de structure) a une fonction différente que son pendant humain XPC. En effet, les levures *rad4Δ* ne peuvent pas du tout réparer les gènes pol.II, mais sont tout de même capables d'une réparation de 50% du brin transcrit des gènes ARN polymérase I (VERHAGE *et al.*, 1996, voir figure 2).

Dans le but d'investiguer davantage les fonctions de Rad4, nous avons créé une souche de délétion *rad4Δ* (voir tableau 1) dans le but d'en étudier le comportement de sa chromatine et de sa transcription ribosomale pendant la NER. Également, non seulement nous voulons confirmer les résultats d'une réparation brin spécifique dans les ADNr (VERHAGE *et al.*, 1996 et DULK *et al.*, 2005) de *rad4Δ*, mais du coup conforter notre hypothèse selon laquelle cette réparation serait due à la réparation couplée à la transcription (TCR) dans les ADNr de cette souche. En effet, seule la réparation dans les ADNr totaux a été testée; or, peut-être est-ce seulement les brins transcrits des gènes activement transcrits qui sont réparés. Considérant que des levures en phase exponentielle ont environ 50% de leurs gènes ribosomaux actifs, nous aurions ainsi une explication au 50% de réparation obtenue. Afin de vérifier ce postulat, nous séparerons les fractions actives des fractions inactives des gènes ribosomaux pour en étudier la réparation de chacun des brins.

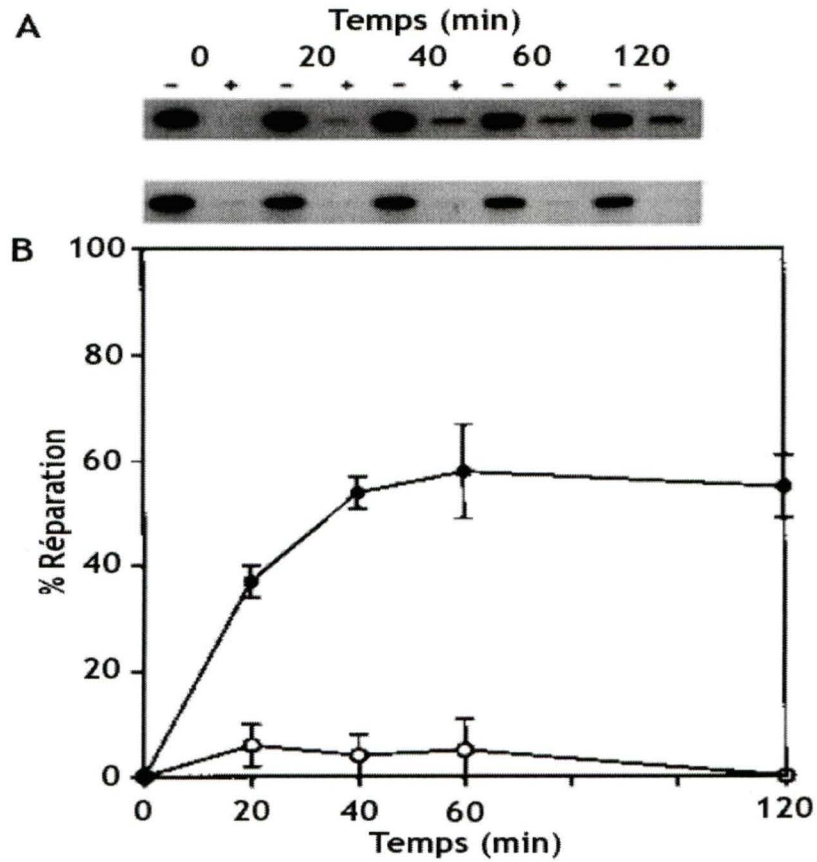


Figure 2 : Réparation du brin transcrit de l'ADNr total chez *rad4Δ* selon VERHAGE *et al.*, 1996. A) T4 endonucléase V pendant la NER de cellules *rad4Δ* (souche MGSC131, VERHAGE *et al.*, 1996). L'ADN a été extrait à chaque temps de réparation, puis digéré par HindIII. Ensuite, chaque échantillon est divisé en deux, un est traité à la T4 endo V (+), l'autre non (-). Une migration sur gel et un buvardage de type Southern, suivi d'une hybridation avec des sondes spécifique soit au brin transcrit (TS : « transcribed strand »), soit au brin non-transcrit (NTS : « non-transcribed strand ») permet d'évaluer la réparation.

B) La réparation en fonction du temps de réparation selon les quantifications des essais T4 endonucléase V. Chaque point est la moyenne de trois expériences \pm les écart-types.

2. Matériel et méthodes

2.1. Création des mutants de délétion *rad1Δ*, *rad4Δ* et *rad14Δ*

Un fragment PCR du gène KanMX4 a été produit à l'aide d'oligonucléotides de 60 nucléotides de long : 20 nucléotides ayant de l'analogie pour les extrémités du gène KanMX4 (en plasmide) et 40 ayant de l'homologie avec les extrémités de soit le gène RAD1, RAD4 ou RAD14 dans le génome. Des levures de type sauvage RAD⁺ (JS311, voir tableau 1 et SMITH *et al.*, 1999) ont été transformés avec chacun des fragments PCR, puis la recombinaison de ces fragments dans le génome a été confirmée d'abord par sélection sur milieu YPD contenant 300ug/ml de généticine (KanMX4 confère la résistance contre cet antibiotique). Ensuite, des colonies ont été isolées, puis une carte de restriction sur l'ADN génomique (avec au moins quatre différentes enzymes) a été effectuée par buvardage de type Southern avec une sonde ciblant KanMX4. Enfin, des PCR amplifiant le gène délété (RAD1, RAD4 ou RAD14) ou KanMX4 a été fait sur chacune des nouvelles souches. L'absence de produits pour le gène délété et la présence du marqueur de sélection, puis des tests phénotypiques (sensibilité aux irradiations UV-C sur pétri) ont fini de confirmer l'identité de nos souches *rad1Δ*, *rad4Δ* et *rad14Δ* (tableau 1).

Souches	Génotypes
JS311	MAT α <i>his3Δ200 leu2Δ1 met15Δ0 trp1Δ63 ura3-167 RDN1 ::Ty1-MET15, mURA3/HIS3</i>
<i>rad1Δ</i>	JS311, RAD1 :: KanMX4
<i>rad4Δ</i>	JS311, RAD4 :: KanMX4
<i>rad14Δ</i>	JS311, RAD14 :: KanMX4

Tableau 1 : Souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* utilisées. Le type sauvage est une souche RAD⁺ JS311 (Smith *et al.*, 1999), les mutants de délétion *rad1 Δ* , *rad4 Δ* et *rad14 Δ* ont été produits par recombinaison homologue de produits PCR transformés de KanMX4 flanqué de 40 nucléotides du gène d'intérêt sur la souche JS311.

2.2. Décompte de colonies sur pétri suite à une irradiation de différentes doses d'UV

Des cultures exponentielles (densité optique à 660nm = 0,4) des souches de type sauvage et *rad4Δ* ont été produites, puis 1ml de culture a été centrifugée. Les cellules ont été resuspendues dans 1,2ml d'eau stérile (1ml de culture à $OD_{660nm} = 0,4$ équivaut à $1,2 \times 10^7$ cellules) pour obtenir 10^6 cellules/100ul. Des dilutions en série ont été faites (jusqu'à 10^1), puis 100ul de chaque dilution a été étalé sur 5 pétris YEPD. Un de ces 5 pétris est mis immédiatement dans un four à 30°C, dans le noir, les 4 autres seront soumis à des doses d'UV-C (pic d'absorption à 254_{nm}) de 20, 40, 80 et 160J/m² pour le type sauvage et de 5, 10, 20 et 40J/m₂ pour la souche *rad4Δ*. Ces pétris seront ensuite incubés dans un four à 30°C, dans le noir, pendant 72 heures.

Par la suite, pour chaque dose de chaque souche, on choisit la dilution donnant entre 30 et 300 colonies pour s'assurer d'un comptage juste et significatif. Nous considérons chaque colonie comme étant au départ une cellule ayant survécu à l'irradiation, puis ayant formé une colonie. Nous comptons les colonies, puis, tenant compte de la dilution, extrapolons le nombre de cellules totales s'étant divisées suite à l'irradiation. En comparant avec les comptes faits sur les pétris non irradiés, un pourcentage de survivant en est tiré.

2.3. Irradiation des cellules aux UV et réparation

Les cellules de levure *Sacchamyses cerevisiae* ont crut dans du milieu complet YEPD à 30°C, 225 rpm jusqu'en début de phase exponentielle ($D.O_{600nm} = 0,4$, environ $1,3 \times 10^7$ cellules/ml). Les cellules sont centrifugées, puis resuspendues dans du PBS sur glace dans une concentration finale de 1×10^8 cellules. Les cellules ont été irradiées par 180 J/m^2 d'UV-C (pic à 254nm); la couche de liquide ne dépassant pas 1mm dans le contenant servant à chaque irradiation. La dose d'UV est déterminée par un UV-mètre détectant principalement 254nm de longueur d'onde. Par la suite, les cellules sont centrifugées, puis resuspendues dans du YEPD et mises à 30°C, 225 rpm, dans le noir complet pour différents temps de réparation (30, 60, 120 et 240 minutes).

2.4. Préparation de noyaux de levures

À chaque temps de réparation (incluant avant irradiation (-UV) et tout de suite après irradiation (+UV)), les cellules (2×10^9) sont resuspendues dans 1,5ml de solution NIB (50mM MOPS, pH 8,0; 150mM K-Acétate; 2mM MgCl_2 ; 0,5mM Spermine; 0,15mM Spermidine), dans des tubes à fond rond de 15ml contenant 1,5ml de billes de verre de $\approx 0,5\text{mm}$ de diamètre. Les cellules ont été brisées par 16 vortex de puissance maximale de 30 secondes chaque (avec des intervalles sur glace de 30 secondes entre chaque vortex).

Après transfert du liquide dans un nouveau tube, les billes de verre ont été lavées avec 2 fois 1ml et une fois 0,5ml, les lavages étant ajoutés au nouveau tube. Les tubes sont centrifugés à 3500rpm, 2,5 minutes. Le surnageant (4ml) est récolté, le culot est resuspendu dans 2ml de NIB puis centrifugé à 3500rpm, 2,5 minutes. Ce surnageant est ajouté aux 4ml conservé (total 6ml), puis centrifugé dans plusieurs tubes 2ml (Eppendorf) à 13000rpm, 5 minutes. Les culots d'un même temps de réparation sont resuspendues successivement avec 200ul de NIB (aucun agrégat ne doit subsister), puis les tubes sont rincés avec 600ul de NIB (total 800ul de noyaux/ temps de réparation). Les noyaux sont enfin aliquotés par 100ul, un échantillon de 10ul est prélevé pour déterminer la concentration de protéine des noyaux par Bradford (voir TRO). Les aliquots sont conservés dans le noir à -80°C pour usage ultérieur (voir figure 3 pour schéma expérimental).

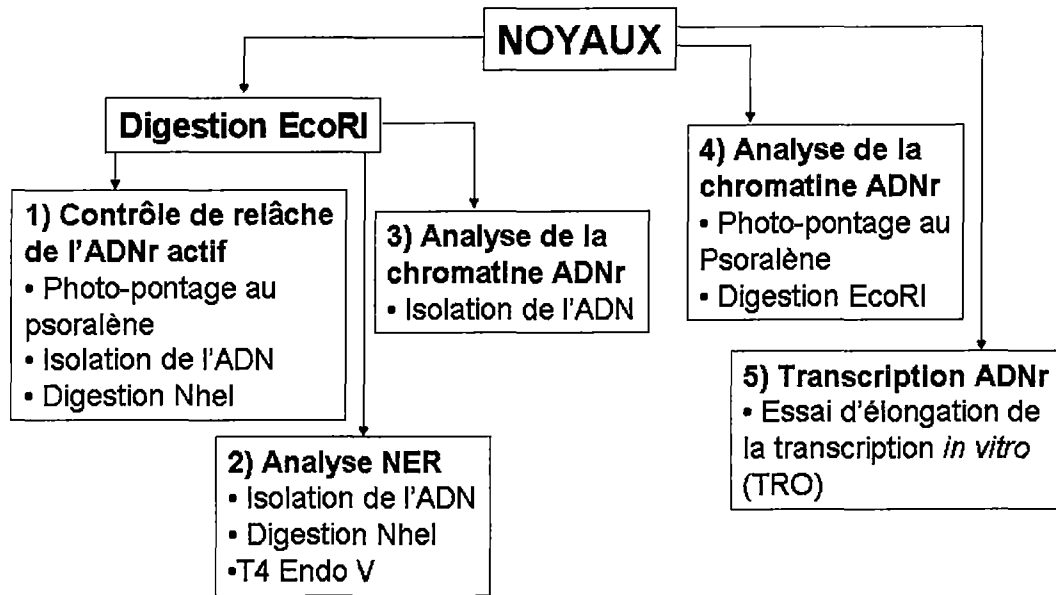


Figure 3 : Design expérimental. Les noyaux provenant des différentes souches de levures isolés à différents temps de réparation sont isolés, aliquotés et congelés à -80°C . Une digestion des noyaux par EcoRI permet de libérer un fragment d'ADNr actif de 2,9kb, laissant l'ADNr inactif intact et permet de faire soit un contrôle de relâche de l'ADNr actif (1; voir figure 4), soit une analyse NER des fractions actives et inactive par T4 Endo-V (2; voir figures 5 et 12), soit un essai de digestion de noyaux par EcoRI (3; voir figures 7 et 9). Les noyaux peuvent aussi être directement photo-pontés au psoralène (4; voir figures 6, 9 et 13) ou bien être utilisés pour un essai d'élongation de transcription *in vitro* (5; voir figures 8 et 14).

2.5. Photo-pontage des noyaux au psoralène

Un aliquot de 100ul de noyaux est dilué dans 700ul de NIB total, puis 1ul de psoralène (800ug/ml dans DMF) y est ajouté. Après 15 minutes dans le noir sur glace, la suspension nucléaire est irradiée 10 minutes sous UV-A (pic majeur à 365nm) dans une plaque 24 puits sur glace. Ces étapes sont répétées à 3 reprises. L'ADN est extrait des noyaux, digéré par EcoRI (20U), puis analysé sur gel et buvardage Southern avec une sonde ribosomale (voir figure 1).

2.6. Digestion de noyaux par EcoRI

Un aliquot de 100ul de noyaux pour chaque temps de réparation (ou de phase de croissance) est centrifugé à 13000rpm dans le noir pendant 2 minutes, puis est resuspendu dans 500ul de tampon EcoRI 1X (aucun agrégat ne doit subsister). Chaque échantillon sera digéré par 100U d'enzyme EcoRI pendant 15 minutes à 37°C, 550rpm, dans le noir. La réaction sera stoppée par l'ajout de 10ul d'EDTA 0,5M sur glace. L'ADN sera extraite, puis une partie sera chargée sur midi-gel d'agarose 1%; la migration se faisant à 80V pour 3 heures. Un buvardage Southern avec une sonde d'ADNr (28S) permettra de révéler une bande majeure de 2,9 kb soulignant de multiples bandes résultant de digestions partielles. En parallèle, un volume égale d'ADN que celui mis sur gel sera dilué dans 1,5ml total de NaOH 0,4M

pour chaque échantillon, puis divisé en 3 X 500ul (triplicatas) sur Slot-Blot (révélé par la même sonde ribosomale) pour témoigner de la quantité d'ADN exacte chargée dans chacune des pistes. Les signaux des bandes de 2,9kb seront quantifiés par ImageQuant, puis corrigé par les signaux obtenus par SlotBlot. Les signaux seront comparés avec le -UV (étant par défaut égale à 1) pour suivre l'accessibilité relative de l'ADNr (à cause de sa structure chromatinienne) à travers les différents temps de réparation.

2.7. Essai T4-Endonucléase V, ADNr total

L'ADN est extrait d'un aliquot de 100ul de noyau (pour chaque temps de réparation), puis est digéré par EcoRI (20U). L'ADN est extraite au phénol/chloroforme/alcool isoamyl (25 :24 :1), puis au chloroforme, avant d'être précipité à l'isopropanol. L'ADN est resuspendu dans 52ul de tampon T4 Endo V 1X (50mM Tris-HCl pH7,5; 5mM EDTA), puis séparé en deux fractions égales de 26ul. À l'une des fractions sera ajouté 4ul d'enzyme T4 Endonucléase V ($\approx 0,5U$) et constituera l'échantillon +T4, à la fraction restante sera ajouté 4ul de tampon T4 Endo V 1X (contrôle -T4). Tous les échantillons (-UV, 0, 30, 60, 120 et 240 minutes de réparation; + ou - T4) sont placés à 37°C pendant 1 heure. La réaction est stoppée par l'ajout de 6ul de teinture d'électrophorèse alcalin 6X (*alkaline loading buffer* 6X : 300mM NaOH; 6mM EDTA; 18% Ficoll; 0,15% vert de bromocrésol; 0,25% Xylène

cyanol). 18ul de chacun des échantillons seront chargés sur maxi-gel (20cm X 25cm) d'agarose 1% (dissout dans 50mM NaCl, 1mM EDTA) pré-équilibré pendant 4 heures dans la solution d'électrophorèse alcaline (50mM NaOH, 1mM EDTA), puis seront migrés à 35V pendant 24 heures. Ensuite, le gel sera buvardé à la Southern, puis hybridé avec soit une sonde d'ADN (28S, voir figure 1) contre le fragment EcoRI de 2,95kb des gènes ribosomiaux (pour les mutants *rad1Δ* et *rad14Δ*), soit avec une sonde d'ARN spécifique au brin (transcrit ou non transcrit) également contre le fragment EcoRI de 2,9kb des gènes ribosomiaux (pour le type sauvage et le mutant *rad4Δ*). Une exposition par cassette de phosphore permettra la quantification des signaux (par le programme ImageQuant) de la bande de 2,9kb de chaque piste. Le ratio entre le signal +T4 et le signal -T4, puis sa comparaison avec le ratio de l'échantillon +UV (0 minute), donnera un pourcentage de réparation pour chaque temps de réparation.

2.8. Essai T4-Endonucléase V, séparation de l'ADNr actif et inactif

400ul de noyaux seront centrifugés à 13000rpm, 5 minutes, puis resuspendus dans 500ul de tampon EcoRI 1X. Ils seront ensuite digérés par 100U d'enzyme EcoRI pendant 15 minutes à 37°C, 550rpm. La réaction est arrêtée par l'ajout de 10ul d'EDTA 0,5M sur glace. Un aliquot de 100ul sera conservé à -80°C pour vérifier la séparation de l'ADNr actif de inactif par

photo-pontage au psoralène. L'ADN est extrait du restant des noyaux (400ul), puis digéré par NheI. Après extraction au phénol/chloroforme/isoamyl (25 :24 :1), puis au chloroforme, l'ADN est précipité à l'isopropanol. L'ADN est resuspendu dans 52ul de tampon T4 Endo V 1X (50mM Tris-HCl pH7,5; 5mM EDTA), puis séparé en deux fractions égales de 26ul. À l'une des fractions sera ajouté 4ul d'enzyme T4 Endonucléase V (\approx 0,5U) et constituera l'échantillon +T4, à la fraction restante sera ajouté 4ul de tampon T4 Endo V 1X (contrôle -T4). Tous les échantillons (-UV, 0, 30, 60, 120 et 240 minutes de réparation; + ou - T4) sont placés à 37°C pendant 1 heure. La réaction est stoppée par l'ajout de 6ul de teinture d'électrophorèse alcalin 6X (*alkaline loading buffer* 6X : 300mM NaOH; 6mM EDTA; 18% Ficoll; 0,15% vert de bromocrésol; 0,25% Xylène cyanol). 18ul de chacun des échantillons seront chargés sur maxi-gel (20cm X 25cm) d'agarose 1% (dissout dans 50mM NaCl, 1mM EDTA) pré-équilibré pendant 4 heures dans la solution d'électrophorèse alcaline (50mM NaOH; 1mM EDTA), puis seront migrés à 35V pendant 45 heures. Le tampon d'électrophorèse doit être changé après 16h et 25h de migration pour contrer l'effet de l'acidification du tampon par le carbonate. Ensuite, le gel sera buvardé à la Southern, puis hybridé avec une sonde d'ARN spécifique au brin (transcrit ou non transcrit) également contre les fragments EcoRI de 2,9kb (fraction active accessible lorsque les noyaux étaient intacts) et NheI de 4,3kb (fraction inactive inaccessible par EcoRI et donc encore disponible pour l'enzyme NheI) des gènes ribosomiaux. Une exposition par cassette de phosphore permettra la quantification des signaux

(par le programme ImageQuant) des bandes de 2,9kb et 4,3kb de chaque piste. Le ratio entre le signal +T4 et le signal -T4, puis sa comparaison avec le ratio de l'échantillon +UV (0 minute), donnera un pourcentage de réparation pour chaque temps de réparation, dépendamment du brin et de la fraction d'ADNr.

2.9. Vérification de la séparation de l'actif et de l'inactif par psoralène

Aux aliquots de 100ul de noyaux digérés par EcoRI obtenus en parallèle à l'essai de T4 Endonucléase V (séparation actif/inactif), 600ul de NIB et 1ul de psoralène (800ug/ml dans du DMF) sont ajoutés. Après 15 minutes dans le noir sur glace, la suspension nucléaire est irradiée 10 minutes sous UV-A (pic majeur à 365nm) dans une plaque 24 puits sur glace. Ces étapes sont répétées à 3 reprises. L'ADN est extrait des noyaux, digéré par NheI (20U), puis purifié. En parallèle, 200ul de noyaux provenant de cellules en phase exponentielle de croissance sont photo-pontés au psoralène tel que décrit ci-haut. L'ADN en est extrait; la moitié de l'échantillon sera digéré par EcoRI, l'autre par NheI (contrôles).

2.10. Essai d'élongation de transcription sur noyaux (TRO)

À un aliquot de 100ul de noyaux sera ajouté 100ul de solution de transcription 2X (1mM d'ATP, CTP et GTP, 80 µM UTP, 5 mM d'acétate de

magnésium, 90 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 8% glycérol, 0.1 mM EDTA pH8.0, 5 mM DTT et 0,1mCi ³²P-αUTP, 800Ci/mmol) sur glace. Après 5 minutes d'incubation sur glace, les échantillons seront placés à 25°C, 550rpm pendant 10 minutes. La réaction sera arrêtée par l'ajout de 1ml de Trizol contenant une sonde d'ARN spécifique à HMGA murin (sonde agissant comme contrôle interne : ce gène n'existe pas chez la levure). Suite à l'extraction de l'ARN, les échantillons seront quantifiés par spectrophotométrie à 260nm. En parallèle, un Slot-blot sur lequel sera fixé en triplicata 10ug d'un plasmide portant le fragment HindIII de l'ADNr de *S.cerevisiae* (pTZ19-rDNA); un autre triplicata portera 10ug d'un plasmide portant le gène HMGA (pGEM-HMGA1) et ce pour chaque échantillon. La membrane sera coupée en 6 sections égales (chacune portant un triplicata de pTZ19-rDNA et un triplicata de pGEM-HMGA1), chacune étant hybridé avec 0,5ug d'ARN obtenu par TRO. Après exposition sur écran de phosphore, les triplicatas ADNr seront quantifiés, puis corrigés par les signaux HMGA correspondants. La quantité de protéines des échantillons de noyaux sera évaluée en prenant un aliquot de 10ul, puis en faisant un essai de Bradford, dans le but d'évaluer la quantité de noyau utilisé pour effectuer la TRO. La quantité de noyaux étant également prise en compte, les résultats seront comparés par rapport au –UV (par défaut ayant une transcription relative de 1), puis compilés.

3. Résultats

3.1. La digestion de noyaux par EcoRI libère la fraction active; la digestion subséquente par NheI de l'ADN isole la fraction inactive

À chaque temps de réparation, des noyaux ont été digérés par EcoRI pour effectuer un essai T4 endonucléase V (voir plus bas). Un aliquot de noyaux de chaque temps a été traité au psoralène, puis l'ADN en a été extraite et digéré par NheI. Puisque les deux sites EcoRI d'intérêt sont inclus dans les deux sites NheI, la digestion par NheI ne devrait affecter que les ADNr non digérés par EcoRI.

Comme il est montré dans la figure 4, la digestion de noyaux par EcoRI ne libère que les ADNr actifs (comparez les contrôles des pistes 2 et 14 avec les échantillons 5 à 11), les échantillons étant alignés avec la bande active (retardée) des contrôles. De plus, la digestion subséquente par NheI affecte majoritairement la fraction inactive des ADNr, car les bandes NheI des échantillons (pistes 5 à 11) correspondent à la fraction inactive des contrôles (pistes 4 et 12), c'est-à-dire la bande moins retardée. Ainsi, EcoRI ne digère que les ADNr actifs, car les fractions inactives, nucléosomales, inhibent l'action des enzymes de restriction. Les contrôles, quant à eux, consistent d'ADN génomique digéré soit par EcoRI (pistes 1 et 15) ou par NheI (pistes 3 et 13) et de noyaux photo-pontés au psoralène, puis digéré soit par EcoRI

-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	UV (140J/m2)
-	0	-	0	0	0	1/4	1/2	1	2	4	0	-	0	-	Temps (heures)
-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	EcoRI (noyaux)
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NheI (noyaux)
-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	Psoralène
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	EcoRI (ADN)
-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	NheI (ADN)

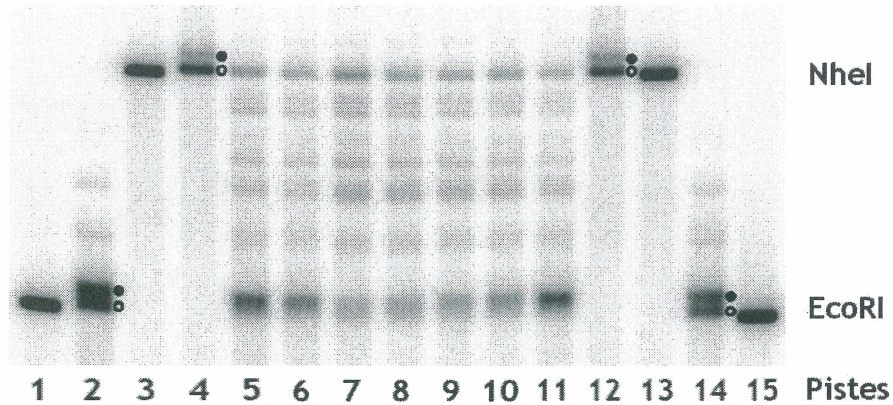


Figure 4 : Séparation des gènes ribosomiaux actifs et inactifs par digestion de noyaux.

Les noyaux proviennent de cellules non-irradiées (piste 5) ou irradiées (pistes 6 à 11), ces dernières étant récoltées à différents temps de réparation (de 0 à 4 heures). Les noyaux sont par la suite digérés par EcoRI, puis photo-pontés au psoralène. L'ADN en est extraite, puis digérée par NheI. Une migration sur gel d'agarose 1%, suivie d'un buvardage de type Southern et d'une hybridation avec une sonde ribosomale. En parallèle, des contrôles sont aussi présent dans le gel; soit ce sont des ADN génomiques digérés par EcoRI (pistes 1 et 15) ou par NheI (pistes 3 et 13), soit ce sont des noyaux photopontés au psoralène dont l'ADN est par la suite digéré par EcoRI (pistes 2 et 14) ou par NheI (pistes 4 et 12). Ces derniers contrôles (noyaux photo-pontés) permettent de savoir si les échantillons correspondent à soit des ADNr actifs (cercles fermés) ou à des ADNr inactifs (cercles ouverts).

(pistes 2 et 14), soit par NheI (pistes 4 et 12). Ces derniers montrent la migration des fractions actives et inactives des gènes ribosomiaux (cercles fermés, actif; cercles ouverts, inactif). La présence de bandes minoritaires entre les bandes EcoRI et NheI est due à la formation observée d'agrégats de noyaux lors de la digestion de ceux-ci par les enzymes de restriction : ainsi, une partie du matériel n'est pas complètement accessible à l'enzyme.

3.2. La NER est plus efficace dans la fraction active des gènes ribosomiaux que dans la fraction inactive

La NER a déjà été observé dans les fractions actives et inactives des gènes ribosomiaux (CONCONI *et al.*, 2002). Or, les conditions utilisées (80J/m² d'UV-C, 100mM hydroxyurée), quoique inhibant la synthèse d'ADN, influence la structure de la chromatine des gènes ribosomiaux (manuscrit en cours). Pour pallier ce problème, nous avons utilisé 180J/m² d'UV-C, sans hydroxyurée (l'agent causant les changements). Cette dose d'UV-C à elle seule est capable d'inhiber la synthèse réplivative d'ADN durant les temps de réparation observés (HOLMQUIST et MAHER, 2002). À cette dose d'UV-C, le nombre moyen de CPD induit sur le fragment EcoRI observé de 2,9kb (actif) est de $1,5 \pm 0,1$ pour le brin transcrit et de $1,2 \pm 0,1$ pour le brin non-transcrit,

tandis que pour la fraction NheI observée de 4,3kb (inactif), on obtient 2,4 CPD \pm 0,1 pour le brin transcrit et 2,0 CPD \pm 0,2 pour le brin non-transcrit (moyenne \pm écart-type de 3 expériences).

La digestion par EcoRI de noyaux irradiés, puis l'isolation d'ADN suivie d'une digestion par NheI a permis de séparer les fractions actives et inactives de la chromatine ribosomale. L'analyse par essai T4 Endonucléase V d'échantillon de type sauvage sur gel nous a donné les résultats montrés à la figure 5A et mis en graphique à la figure 5C. Le brin transcrit de la fraction active (cercles pleins) répare plus rapidement que le brin non-transcrit de la même fraction (cercles vides), confirmant qu'il y a TCR dans les gènes ribosomiaux des levures (CONCONI *et al.*, 2002). De plus, le brin non transcrit de la fraction active est réparé plus rapidement que les deux brins de la partie inactive de l'ADNr, suggérant que la NER a plus de facilité à accéder à la chromatine active qu'à la chromatine inactive des gènes ribosomiaux. Autre contraste dans la réparation des deux chromatines : la fraction active se répare tout d'abord très rapidement, puis ralentit avec le temps, tandis que la fraction inactive voit sa réparation être constante tout le long de l'essai. Dans le but de déterminer si les éventuels changements chromatiniens de l'ADNr suite à une irradiation aux UV sont dus à la NER, nous avons observé l'élimination de lésions CPD dans l'ADNr total des souches *rad1Δ* et *rad14Δ* (figure 5B). Comme prévu, aucune réparation NER n'est possible dans ces souches de délétion (*rad1Δ* – ligne bleue ; *rad14Δ* – ligne rouge).

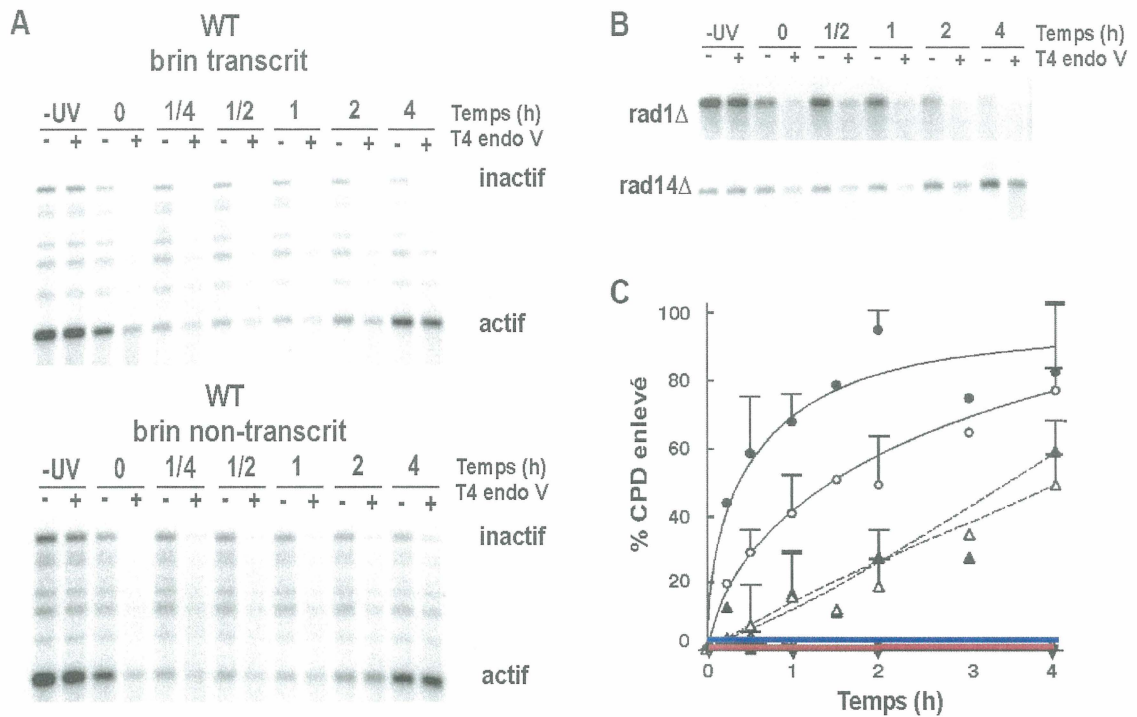


Figure 5 : A) Réparation de l'ADNr actif et inactif chez le type sauvage. -UV correspond à l'échantillon non-irradié, tandis que les échantillons 0 à 4 correspondent au temps de réparation en heures après irradiation. Les échantillons sont séparés sur gel d'agarose 1% alcalin, buvardés puis hybridés à l'aide de ribo-sondes brin-spécifiques (transcrit ou non transcrit).

B) Réparation des deux brins de l'ADNr total des mutants *rad1Δ* et *rad14Δ*. À chaque temps de réparation, l'ADN est extraite des noyaux, puis digéré par EcoRI. Les traitements à la T4 Endonucléase V, le gel alcalin et le buvardage ont été faits comme décrit en A. L'hybridation a été effectuée à l'aide d'une sonde d'ADN

C) Quantification par Phosphoimager. La réparation est évaluée comme le pourcentage de CPD enlevés par rapport au temps de réparation. Sur le graphique, les points désignent la fraction active, les triangles la fraction inactive. Les symboles pleins désignent le brin transcrit, tandis que les symboles vides désignent le brin non-transcrit (type sauvage). La ligne bleue représente la réparation du mutant *rad1Δ*, la ligne rouge la réparation de *rad14Δ*.

3.3. L'assemblage de la chromatine suite à une irradiation UV est indépendant de la NER

Nous avons étudié la chromatine pendant la NER de deux différentes façons, soit le photo-pontage au psoralène et l'accessibilité aux enzymes de restriction. Premièrement, des noyaux de chacun des temps de réparation ont été photo-pontés, puis l'ADN a été extraite et digérée par EcoRI. Dans la figure 6A, il est montré que les gènes ribosomaux sont divisés en deux populations distinctes : une bande retardée représentant la fraction active et une bande moins retardée correspondant à la fraction inactive. Ce patron est aussi visible immédiatement après l'irradiation (temps 0). Or, après 30 minutes jusqu'à 1 heure de réparation, le type sauvage ne possède plus une fraction active évidente; au lieu, il y a présence d'une traînée représentant des ADNr partiellement inactivés aboutissant à une bande inactive franche. Néanmoins, après 2 et 4 heures de réparation, les proportions actif/inactif sont rétablies de manière semblable à l'état initial. Ces résultats suggèrent un réarrangement de la chromatine durant la NER.

Or, nous voulions savoir si ces réarrangements sont le résultat de la synthèse d'ADN suivant l'excision d'un dommage par la NER pendant la réparation. À cet effet, le photo-pontage a également été effectué sur les mutants *rad1Δ* et *rad14Δ*, tous deux complètement déficients en NER. Avant irradiation et tout de suite après (-UV et temps 0), les ADNr de mutants

montrent le même patron actif/inactif présent chez le type sauvage. Pendant l'incubation de réparation, il y a encore une fois disparition de la bande active et formation d'une traînée formée d'ADNr partiellement inactifs aboutissant à la bande inactive. Néanmoins, peu importe les temps de réparation, chez les mutants *rad1Δ* et *rad14Δ*, il n'y a pas rétablissement des deux populations d'ADNr; la bande active ne revient pas comme chez le type sauvage (Figure 6A).

Ces données sont confirmées en traçant une ligne verticale par-dessus des signaux de chaque piste grâce au programme informatique ImageQuant, puis en calculant l'intensité des signaux par rapport à la distance de migration en millimètres. Les pics sur les graphiques de la figure 6B correspondent à des bandes sur les gels; la quantification va du haut vers le bas. Ainsi, chaque graphique devient une représentation quantitative des gels qualitatifs.

Deuxièmement, une autre méthode a été utilisée pour supporter les résultats du photo-pontage au psoralène, c'est-à-dire la digestion de noyaux par l'enzyme de restriction EcoRI. Ce test est en fait une mesure de l'accessibilité de l'ADNr dans son contexte chromatinien par EcoRI : les sites de restriction couverts de nucléosomes inhiberont EcoRI, alors que les fractions actives sont sensibles à EcoRI. Des noyaux de levures de type sauvage, de *rad1Δ* et de *rad14Δ* (de -UV à 4h après irradiation) ont été digérés par EcoRI, puis l'ADN en a été extraite. Suivant un gel d'agarose et

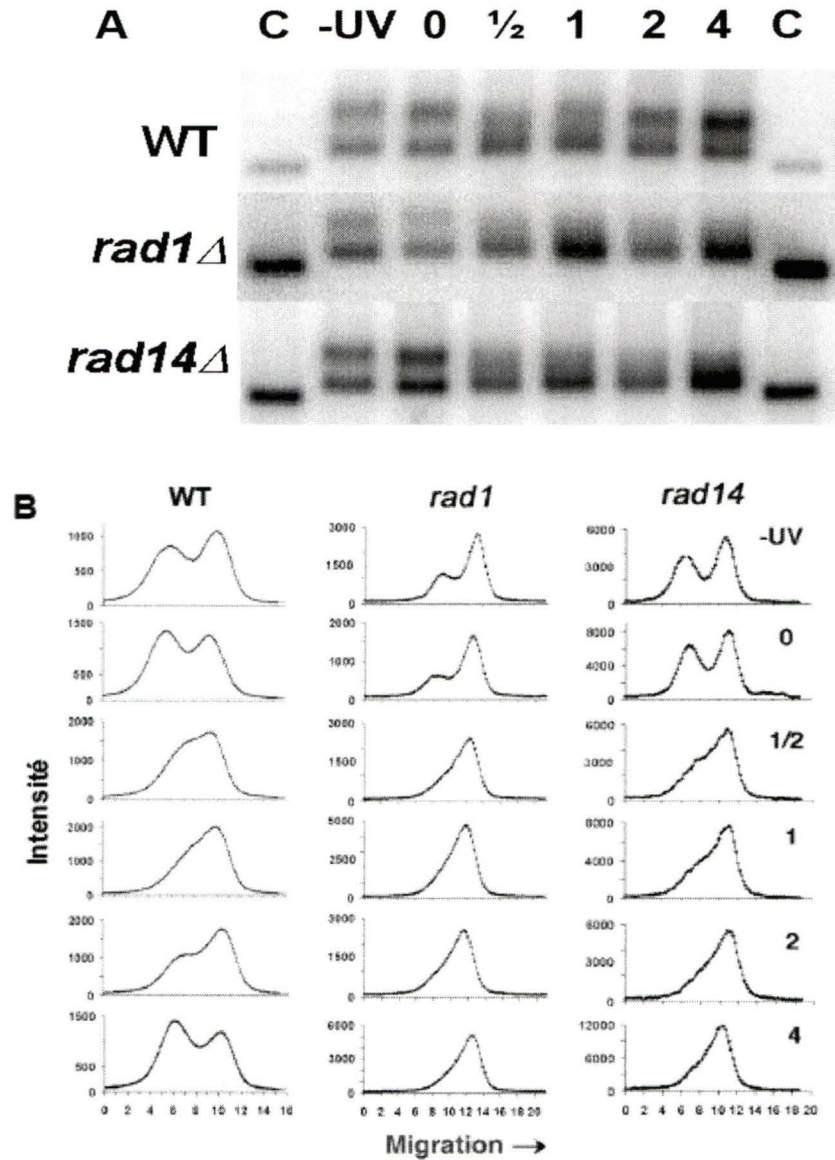


Figure 6: A) Structure chromatinienne des gènes ribosomiaux du type sauvage (WT) et des mutants *rad1Δ* et *rad14Δ* par photo-pontage au psoralène. Les noyaux ont été isolés de cellules non irradiées (-UV), irradiés (0) et réparés pendant différents temps post irradiation (½ à 4 heures). Dans chaque piste, la bande supérieure (lorsque présente) correspond à la fraction active de l'ADNr, tandis que la bande inférieure correspond à la fraction inactive.

B) Graphiques de l'intensité des signaux quantifiés par ImageQuant par rapport à la distance de migration en mm. Le premier pic (lorsque présent) correspond à la fraction active, tandis que le deuxième pic correspond à la bande inactive.

un buvardage de type Southern (figure 7A, partie du haut), les résultats sont quantifiés, puis mis en relation l'un avec l'autre. Pour corriger pour les variations de quantité d'ADN entre chacun des échantillons, nous avons mis un volume d'ADN identique à celui mis sur gel sur un Slot Blot, en triplicatas (figure 6A, partie du dessous). Les quantifications de signaux obtenues par SlotBlot permettent l'obtention des résultats finaux (figure 7B) sur un graphique montrant l'accessibilité relative des gènes ribosomaux à EcoRI par rapport aux temps de réparation pour chacune des souches.

Ces expériences montrent des changements d'accessibilité à EcoRI pendant la NER reflétant les résultats obtenus par photo-pontage au psoralène. Ainsi, pour le type sauvage, avant et tout de suite après irradiation aux UV, l'accessibilité à EcoRI est optimale, puis diminue entre 30 minutes et 1 heure pour finalement se rétablir aux niveaux initiaux à 2 et 4 heures. Par contre, les souches déficientes en NER *rad1Δ* et *rad14Δ* voient leur accessibilité chuter à environ 30% à partir de 30 minutes, et cet état demeure pour toute la durée de l'expérience.

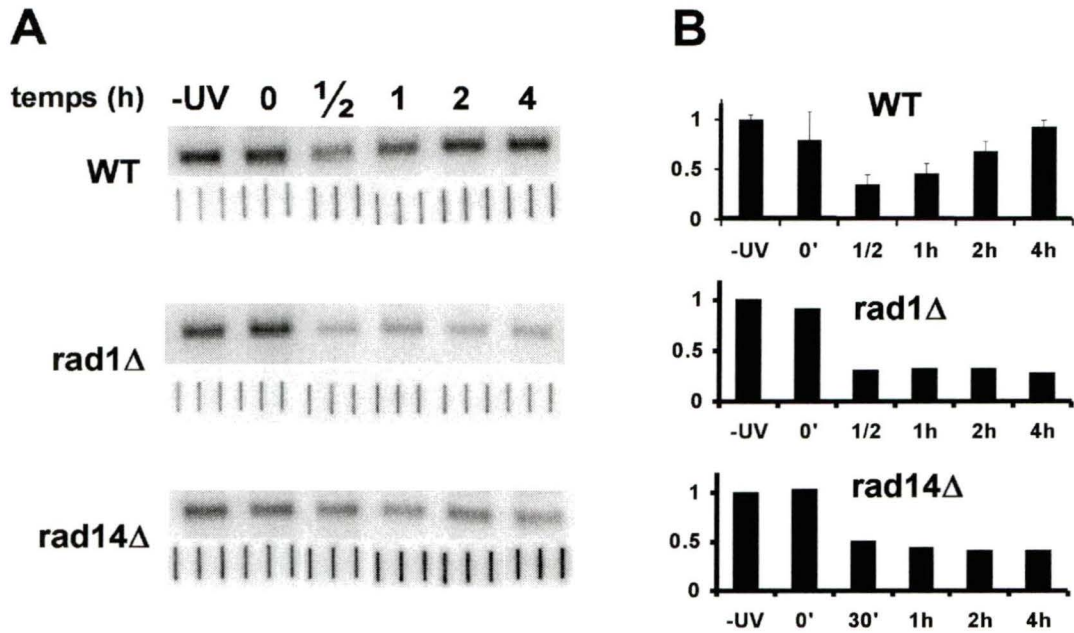


Figure 7 : A) Accessibilité des gènes ribosomaux à EcoRI pendant la NER. Parties du haut : structure de la chromatine ribosomale pendant la NER. Suite à une digestion de restriction par EcoRI sur les noyaux, l'ADN est extrait et séparée sur gel d'agarose. Un buvardage de type Southern permet de quantifier l'intensité de la bande majeure de 2,9kb obtenue suite à l'hybridation avec une sonde ribosomale. Parties du bas : correction du chargement de l'ADN sur gel par fixation d'une quantité égale d'ADN sur SlotBlot en triplicatas. Ces derniers sont quantifiés, la moyenne des triplicatas est utilisée pour corriger les signaux en conséquence.

B) Graphiques d'accessibilité relative des ADNr à EcoRI avant et pendant la NER dans les différentes souches. Chaque temps de réparation est comparé avec le -UV. Trois expériences ont été faites pour le type sauvage; les résultats sont la moyenne des trois expériences \pm l'écart type. Pour *rad1Δ* et *rad14Δ*, les graphiques représentent la moyenne de deux expériences.

3.4. L'inhibition de l'élongation de l'ARN pol. I par les UV corrèle avec l'assemblage de la chromatine; la reprise de transcription correspond au désassemblage de la chromatine et à la réparation des CPD

La présence de dimères sur le brin transcrit bloque la progression de l'ARN polymérase I (HARA *et al.*, 1999). Sachant que l'élongation de l'ARN polymérase I change la structure de la chromatine et que cette dernière affecte la transcription (DAMMANN *et al.*, 1993), nous avons regardé les taux d'ARNr produits pendant la NER dans le but de corrélérer avec la structure de la chromatine. En utilisant 180J/m^2 pour nos expériences, nous formons environ 3,6 CPD dans le brin transcrit du gène 35S (9,1kb de long). Ainsi, en plaçant des noyaux des souches de type sauvage, *rad1Δ* et *rad14Δ* (avant et pendant la NER) dans des conditions permettant l'élongation de la transcription, nous avons observé la réduction de transcription provoquée par les lésions UV. Ainsi, le taux de transcription diminue de moitié pour le type sauvage, immédiatement après irradiation, puis reprend graduellement tout au long de la NER (figure 8). Les souches déficientes en NER *rad1Δ* et *rad14Δ*, quant à elles, voient leur transcription tomber à environ 45% dès le temps 0, sans reprise pour toute la durée de l'expérience (figure 8). Ceci est un reflet de l'incapacité de ces souches de réparer les dimères. Néanmoins, puisque les dimères de pyrimidines bloquent l'élongation de la transcription, pourquoi la transcription est-elle encore relativement haute au temps zéro, où la quantité de CPD est maximale? Considérant qu'il n'y a que 3,6 CPD sur

9,1kb de long sur le brin transcrit, les ARN polymérase situées en amont d'un dommage peuvent encore élonger leur transcription sur une distance limitée, permettant l'incorporation d'une certaine quantité de nucléotides radiomarqués dans les ARN produits.

Après une demi-heure de réparation, la plupart des polymérase en amont d'un dommage ont eu le temps de rencontrer un dommage. De cette manière, en absence de réparation, la transcription est à environ 20% du taux avant irradiation entre 30 minutes et 1 heure. Aussi, le fait que la transcription chute continuellement à partir du temps 0 dans les souches *rad1Δ* (figure 8, barres bleues) et *rad14Δ* (Figure 8, barres rouges) s'explique en considérant que l'essai d'élongation de la transcription sur des noyaux (TRO) ne permet pas l'initiation de la transcription, seulement l'élongation (MARZLUFF et HUANG, 1985).

Après une heure de réparation dans le type sauvage, l'élongation de la transcription reprend lentement. Ceci coïncide avec la réparation du brin transcrit de la fraction active des gènes ribosomiaux. Après deux et quatre heures de réparation, il y a environ 80% des CPD qui sont enlevés du brin transcrit des gènes actifs et l'élongation de la transcription est à 75% de celle obtenu avant irradiation. Donc, la reprise de la transcription des ADNr suite à une irradiation UV semble liée à la réparation de l'ADNr et/ou au désassemblage de la chromatine ribosomiale.

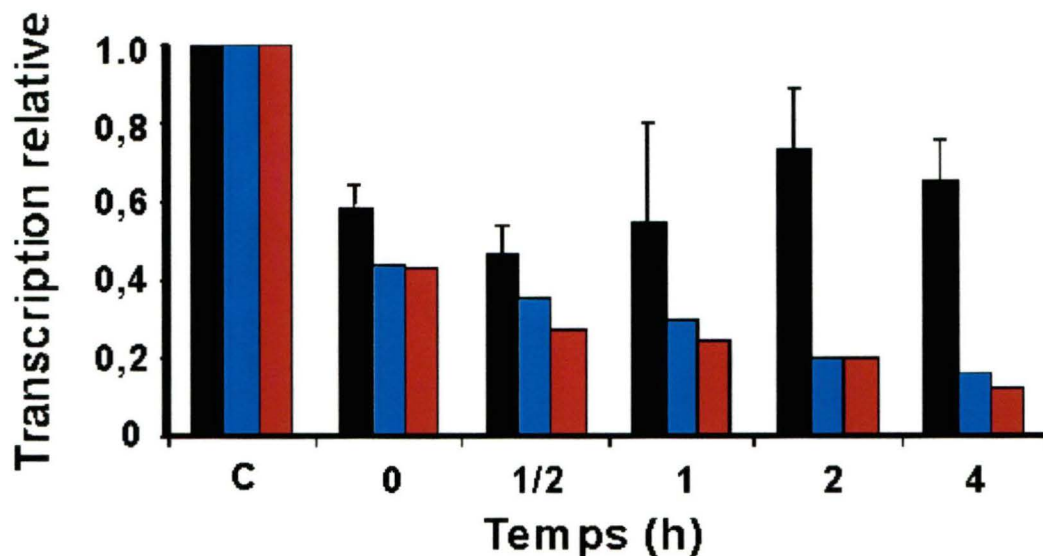


Figure 8 : Élongation de la transcription des ADNr pendant la NER pour le type sauvage, *rad1Δ* et *rad14Δ*. Des noyaux ont été extraits avant et pendant la NER de levures des différentes souches. Après incubation dans des conditions propices à l'élongation de la transcription (TRO), les ARN marqués et purifiés sont utilisés comme ribosonde pour hybrider avec des ADNr fixé sur membrane par SlotBlot. Les membranes sont ensuite exposées sur cassette de phosphore, puis les signaux sont quantifiés et normalisés avec les standards externes correspondants (HMGA). Une valeur arbitraire de 1 est donnée à l'échantillon –UV, les autres temps de réparation ont des valeurs relatives à l'échantillon –UV. Le type sauvage (barres noires) correspond à une moyenne de 3 expériences indépendante \pm l'écart type, tandis que les souches *rad1Δ* (barres bleues) et *rad14Δ* (barres rouges) résultent de la moyenne de 2 expériences indépendantes.

3.5. La diminution d'élongation de la transcription dans des cellules non irradiées ne provoque pas de changements majeurs dans la chromatine des ADNr

Il est connu que la transcription des gènes ribosomiaux est intimement couplée aux phases de croissance chez la levure (WARNER, 1989). Or, suite à une irradiation aux UV, la structure de la chromatine ribosomale change en même temps que l'inhibition de la transcription. En regardant la transcription et la structure de la chromatine dans diverses phases de croissance, nous allons pouvoir déterminer si des changements structurels semblables à ceux observés pendant la NER se produisent entre les phases exponentielles (E), début stationnaires (ES) et stationnaires (S). Ainsi, des noyaux provenant de cellules exponentielles ($O.D._{660nm} = 0,4$), début stationnaire (dès qu'il n'y a plus d'augmentation de densité optique) et stationnaire (18 heures après la phase ES) ont été extraits. Ils ont par la suite été utilisés pour faire les expériences de photo-pontage au psoralène, d'accessibilité à EcoRI et d'élongation de transcription tel que décrit précédemment.

D'abord, le photo-pontage au psoralène nous montre la présence de 2 bandes distinctes en phase E, comme attendu. Pour ce qui est des phases ES et S, la séparation est moindre et les bandes sont moins claires; elles sont brouillées par une traînée entre les deux bandes (figure 9A, partie du haut). Néanmoins, en se fiant aux scans des pistes par ImageQuant et en mettant

les résultats en graphique (figure 9A, partie du bas), la présence de deux pics dans chacune des phases de croissance mettent en évidence des résultats normalement difficiles à interpréter avec précision. Il faut noter que les deux pics des graphiques ES et S sont séparés par un vallon moins creux que les 2 pics de la phase E, témoignant de la présence d'une population de gènes ribosomiaux intermédiaires entre l'actif et l'inactif. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par photo-pontage d'échantillons pendant la NER (entre 30 minutes et 1 heure), où la fraction active n'est pas visible tant sur gel que par son analyse graphique. Ensuite, l'accessibilité à EcoRI a été utilisée pour vérifier d'un autre angle les résultats obtenus par psoralène. Ainsi, les mêmes noyaux (E, ES, S) ont été digérés par EcoRI, puis l'ADN a migré sur gel d'agarose et a été buvardé à la Southern (Figure 9B, haut de la partie de gauche). La quantification et la comparaison des signaux obtenus, après correction du chargement par SlotBlot (Figure 9B, bas de la partie de gauche), nous donnent des résultats suivant ceux obtenus par psoralène. En effet, l'accessibilité diminue à environ 70% en phase ES et retourne à son niveau optimal en phase S, suggérant l'absence de changements majeurs de la structure de la chromatine dans les différentes phases de croissance (figure 9B, partie de droite).

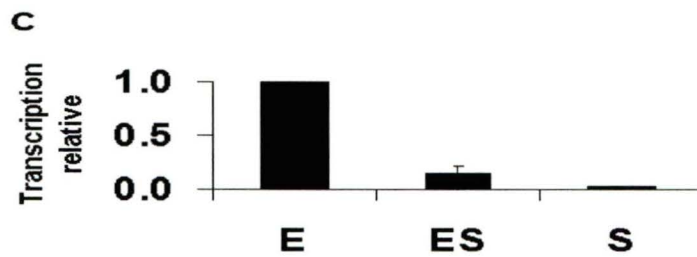
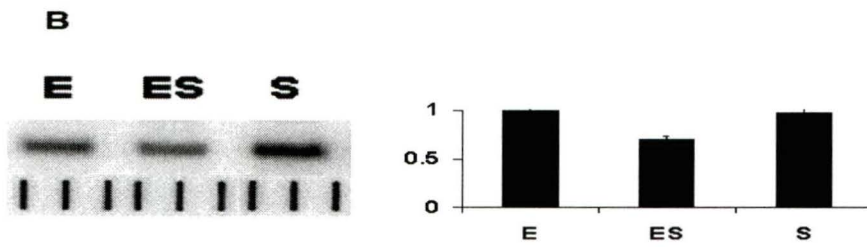
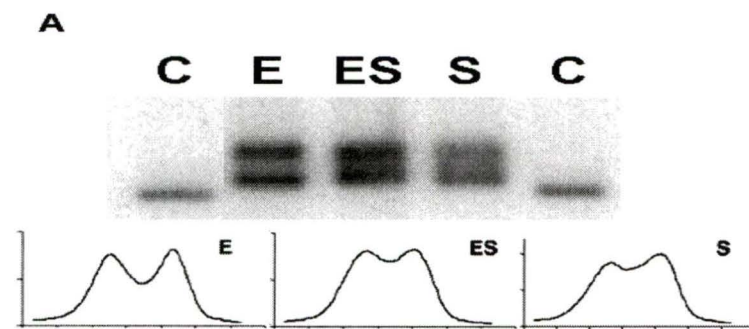


Figure 9 : A) Photo-pontage au psoralène de noyaux provenant de cellules en phase exponentielle (E), début stationnaire (ES) et stationnaire (S). Les bandes obtenues correspondent aux fractions actives et inactives de l'ADNr (partie du haut). La mise en graphique de l'intensité des signaux par rapport à la distance de migration est représentée dans la partie du bas.

B) Accessibilité de EcoRI à des noyaux provenant de cellules en phase E, ES et S. Suite à la digestion, l'ADN est extraite, puis séparé sur gel d'agarose 1%. Un transfert à la Southern et l'hybridation par une sonde ribosomale permet de quantifier les signaux obtenus par cassette de phosphore (gauche, partie du haut). En parallèle, la fixation d'une quantité égale d'ADN (en triplicatas) à celle du gel sur SlotBlot permet de normaliser le chargement d'ADN de chaque puits (gauche, partie du bas). Une fois quantifié et normalisé, un graphique de l'accessibilité relative des noyaux à EcoRI par rapport à la phase de croissance est obtenu, provenant de la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

C) Élongation de la transcription de noyaux provenant de cellules en phase E, ES et S. Les ARN marqués et purifiés sont utilisés comme ribosonde pour hybrider avec des ADNr fixés sur membrane par SlotBlot. Les membranes sont ensuite exposées sur cassette de phosphore, puis les signaux sont quantifiés et normalisés avec les standards externes correspondants (HMGA). Une valeur arbitraire de 1 est donnée à l'échantillon E, les autres phases ont des valeurs relatives à l'échantillon E. Chaque résultat est la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

Enfin, dans le but d'examiner l'élongation de la transcription pendant les phases de croissance, les mêmes noyaux ont été placés en condition optimale pour la transcription. Les ARN radiomarqués extraits de ces noyaux ont servi à hybrider avec une membrane où de l'ADNr est fixée par SlotBlot. Les signaux ont été quantifiés, puis normalisés avec les standards externes pour être mis en graphique (figure 9C). Le résultat obtenu montre une forte diminution de la transcription dès que les cellules sortent de la phase exponentielle. Donc, malgré une baisse marquée de l'élongation de la transcription en phase ES et S, une bonne partie des gènes ribosomiaux est encore sous une conformation active, ce qui contraste avec ce qui est obtenu pendant la NER.

3.6. Le mutant *rad4Δ* répare 60% du brin transcrit des ADNr, malgré qu'il est phénotypiquement très sensible aux UV

La délétion du gène RAD4 chez la levure empêche (comme chez *rad1Δ* et *rad14Δ*) complètement la NER dans le génome non-transcrit et les gènes ARN polymérase II (VERHAGE *et al.*, 1994). Aussi, RAD4 est un gène NER de classe 1; sa délétion rend la levure très sensible aux UV (PRAKASH et PRAKASH, 2000). Or, le mutant *rad4Δ* se distingue dans les gènes transcrits par l'ARN polymérase I; s'il est incapable de réparer le brin non-transcrit de l'ADNr, le brin transcrit est quant à lui réparé à 50% (VERHAGE

et al., 1996). Dans le but de confirmer ces données, nous avons testé les capacités de récupération et de réparation de notre mutant *rad4Δ* par un test de survie et par un essai T4 endonucléase V de ADNr total.

D'abord, nous avons vérifié la capacité des levures (type sauvage et *rad4Δ*) de croître suite à une irradiation en étalant une quantité égale de cellules sur pétri de milieu complet (YPD), puis en y appliquant différentes doses d'UV-C (plus 1 pétri non irradié). Après 72 heures d'incubation à 30°C dans le noir, nous effectuons le décompte des colonies qui se sont formées, puis nous comparons avec les pétris non irradiés de la même souche pour exprimer les résultats en pourcentage de survivant. Nous considérons que chaque colonie représente au départ une cellule ayant survécu (ou ayant récupéré) à l'irradiation, puis ayant crû pour former une colonie. Pour le type sauvage (Figure 10, ligne noire), il y a 8% des cellules capables de récupérer (ou du moins de se répliquer) à des doses de 160J/m², tandis que pour le mutant *rad4Δ*, des doses d'à peine 5J/m² suffisent pour faire chuter le taux de survivant sous les 1% (Figure 10, ligne rouge). Aussi, en appliquant une goutte de dilutions en série sur pétri de YPD de chacune des souches (type sauvage, *rad1Δ*, *rad14Δ* et *rad4Δ*), puis en irradiant à différentes doses (« spot test »), nous constatons que *rad4Δ* est aussi sensible que les deux autres mutants NER de classe I (données non montrées).

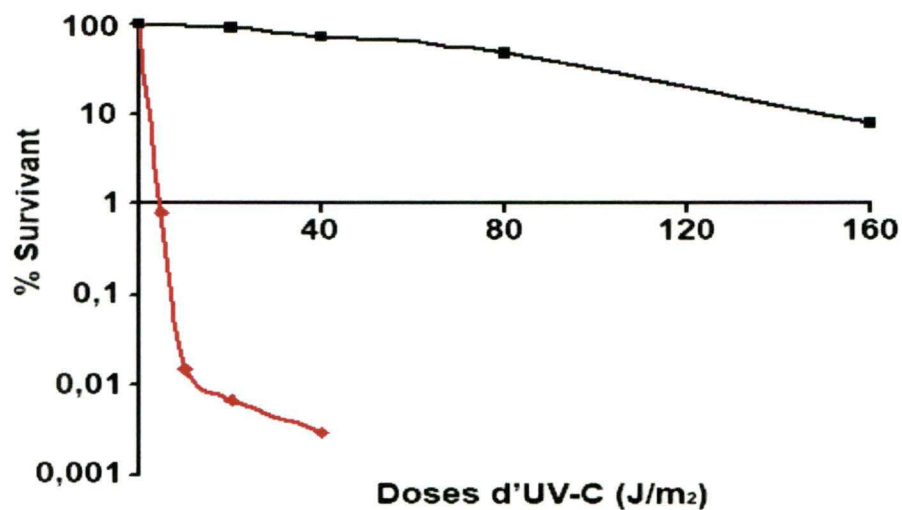


Figure 10 : Courbe de survie du type sauvage et de *rad4Δ*. Une quantité égale de cellule a été placée sur pétris, puis chaque pétri a été irradié par différentes doses ou non irradié. Après 72 heures d'incubation à température de croissance optimale dans le noir, le décompte des colonies est effectué. Le ratio des colonies de chaque dose par rapport au -UV donne les pourcentages de survie. La ligne noire correspond au type sauvage, tandis que la ligne rouge représente *rad4Δ*. Le % de survivant est exprimé sur une échelle logarithmique. Moyenne de 3 expériences indépendantes.

Ensuite, un essai T4 endonucléase V brin-spécifique a été effectué sur de l'ADN provenant de noyaux extraits de cellules *rad4Δ*. Ainsi, suite à la digestion par EcoRI et par la T4 endonucléase V de l'ADN, puis la migration sur gel d'agarose alcalin, un Southern dont la membrane a été hybridé avec soit une sonde contre le brin transcrit ou le brin non transcrit a permis d'évaluer la réparation de chaque brin de l'ADNr (Figure 11A). Les résultats obtenus concordent avec fidélité avec ceux obtenus par le groupe de Brouwer (VERHAGE *et al.*, 1996), considérant que cette équipe n'a été que jusqu'à 2 heures de réparation. En effet, ils avaient obtenu une réparation d'environ 50% dans le brin transcrit et aucune réparation dans le brin non-transcrit, tandis que nos résultats indiquent plutôt 60% de réparation (après 2 heures) dans le TS et d'environ 10% dans le NTS. Après 4 heures, la réparation du brin non transcrit n'augmente guère : elle semble plafonner à 10% (Figure 11B). Or, 4 heures de réparation semblent être suffisant pour ce mutant pour réparer le TS de l'ADNr à près de 90%. Ainsi, même si la cinétique de réparation de *rad4Δ* semble plus lente que celle du type sauvage (ADNr total, voir CONCONI *et al.*, 2002), le mutant finit par réparer au bout de 4 heures autant de CPD que le type sauvage.

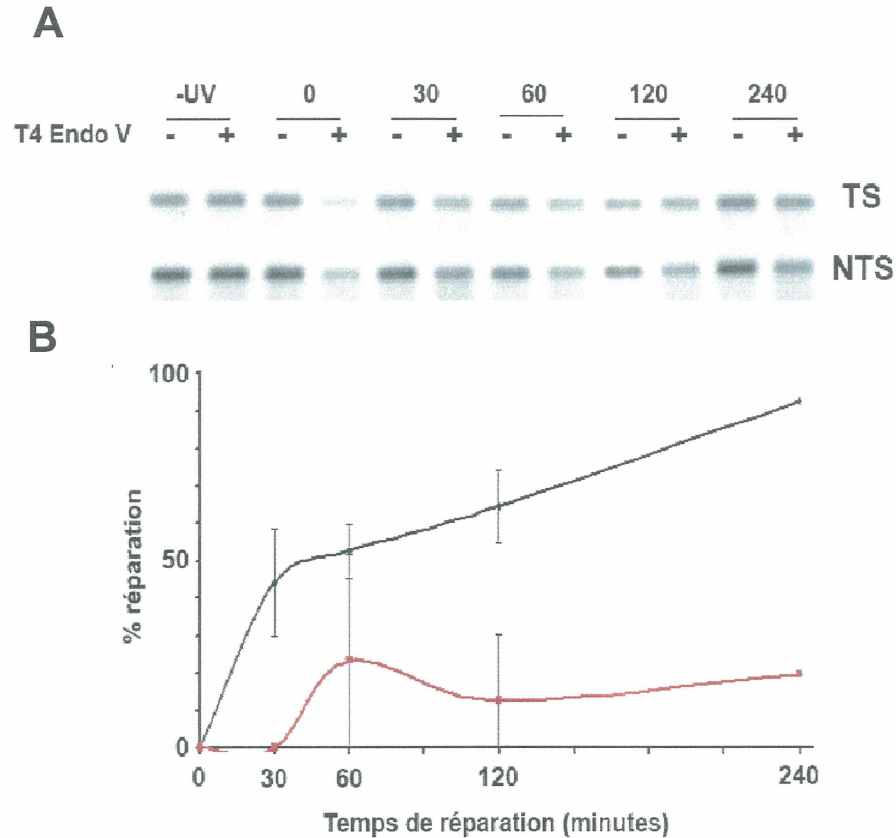


Figure 11 : A) Essai T4 Endonucléase V de l'ADNr total de *rad4Δ*, spécifique aux brins.

À chaque temps de réparation, l'ADN est extraite des noyaux, puis digéré par EcoRI. Les échantillons d'ADN sont séparés en deux; une moitié traitée à la T4 Endonucléase V (+), l'autre moitié avec seulement du tampon (-). -UV correspond à l'échantillon non-irradié, tandis que les échantillons 0 à 4 correspondent au temps de réparation en heures après irradiation. Les échantillons sont séparés sur gel d'agarose 1% alcalin, buvardés puis hybridés à l'aide de ribo-sondes brin-spécifiques (transcrit ou non transcrit).

B) Quantification par Phosphoimager. La réparation est évaluée comme le pourcentage de CPD enlevés par rapport au temps de réparation. La ligne noire correspond au brin transcrit de l'ADNr, la ligne rouge, au brin non-transcrit. Tous les points sont la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes, excepté les points 4 heures (TS et NTS) qui sont la moyenne de deux expériences indépendantes.

3.7. Le brin transcrit de la fraction active des ADNr est mieux réparé que le reste des gènes ribosomiaux chez *rad4Δ*

Un des soupçons initiaux que nous avions expliquant le 50% de réparation du brin transcrit (ADNr total) est que seul le brin transcrit de la fraction active des gènes ribosomiaux est réparé normalement et que le brin non transcrit n'est pas réparé. Puisque 40 à 50% des ADNr sont actifs en phase exponentielle, le mélange des deux fractions (actif + inactif) correspondrait à $\approx 50\%$. Donc, des noyaux de *rad4Δ* pendant la NER ont été digérés par EcoRI (pour libérer la fraction active), puis l'ADN a été extraite et digérée par NheI (pouvant couper que les ADN inactifs non clivés par EcoRI). Suivant un essai T4 Endonucléase V, un gel alcalin et un Southern, une hybridation avec des sondes d'ARNr brin spécifiques nous permettent d'étudier la réparation selon le brin et selon la fraction d'ADNr (Figure 12A à 12D).

Suite à la quantification des données brutes, nous remarquons tout d'abord que chez *rad4Δ*, le brin transcrit de la fraction active (fragment EcoRI de 2,9kb, bas du gel) est réparé presque complètement au bout de 4 heures (figure 12C, ligne noire), à l'instar du type sauvage. Or, le brin transcrit de la fraction inactive est quant à lui réparé à seulement 20% (figure 12C, ligne rouge), tout comme le brin non transcrit, fraction inactive (figure 12D, ligne verte). Dernièrement, le brin non transcrit de la fraction active possède au bout de 4 heures environ 50% moins de CPD qu'au temps 0 (figure 12D,

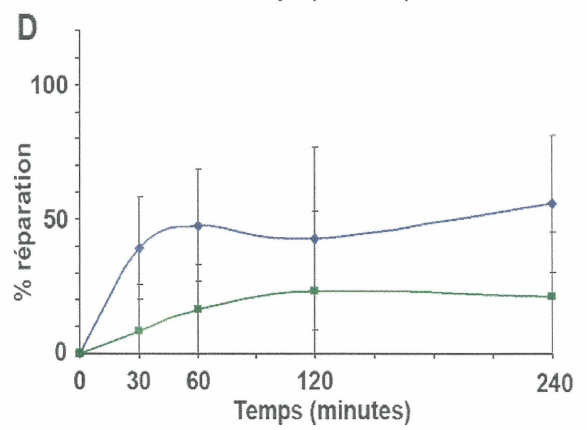
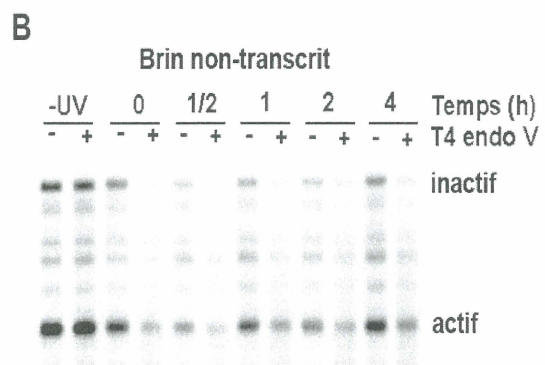
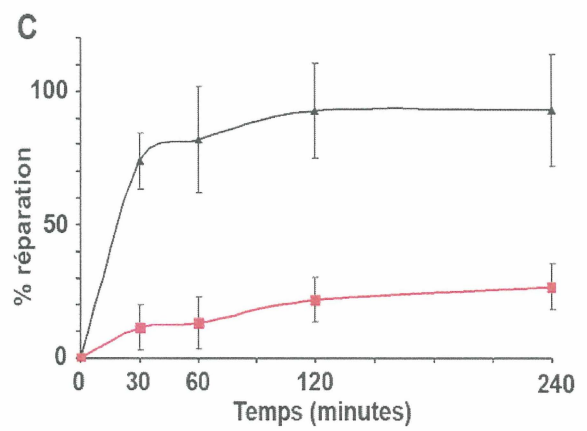
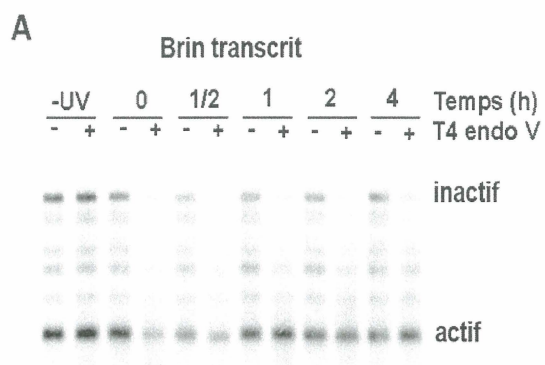


Figure 12 : A) Réparation du brin transcrit des fractions actives et inactives de l'ADNr.

Les noyaux ont été digérés par EcoRI, puis l'ADN a été digéré par NheI. Les échantillons d'ADN sont séparés en deux; une moitié traitée à la T4 Endo V (+), l'autre moitié avec seulement du tampon (-). -UV correspond à l'échantillon non-irradié, tandis que les échantillons 0 à 4 correspondent au temps de réparation en heures après irradiation. Les échantillons sont séparés sur gel d'agarose 1% alcalin, buvardés puis hybridés à l'aide d'une ribosonde spécifique au brin transcrit (TS).

B) Réparation du brin non-transcrit des fractions actives et inactives de l'ADNr. Tel que décrit ci-haut, mais cette fois en utilisant une sonde d'ARN spécifique au brin non transcrit.

C) et D) Quantification par Phosphoimager du brin transcrit (C) et du brin non transcrit (D). La réparation est évaluée comme le pourcentage de CPD enlevés par rapport au temps de réparation. **C)** La ligne noire désigne la réparation du brin transcrit de la fraction active (TS actif), la ligne rouge, le brin transcrit de la fraction inactive (TS inactif). **D)** La ligne bleue représente le brin non transcrit de la fraction active (NTS actif), la ligne verte le brin non transcrit de la fraction inactive (NTS inactif). Chaque courbe provient de la moyenne \pm l'écart type de 6 expériences indépendantes.

ligne bleue). De ces données deux choses peuvent en être tirées: en premier lieu, la différence marquée de réparation entre le brin transcrit de la fraction active et les autres parties de l'ADNr suggère qu'il y a de la réparation couplée à la transcription (TCR) dans ce mutant de délétion. D'autant plus que la courbe du brin transcrit, fraction active de *rad4Δ* est très semblable à celle correspondante du type sauvage (voir figure 5C). En deuxième lieu, le brin non-transcrit de la fraction active répare 20 à 30% plus de CPD que les deux brins de la fraction inactive. Ceci suggère une plus grande facilité à réparer la chromatine ribosomale active que la chromatine inactive en absence de Rad4. En fait, la différence majeure entre la réparation des gènes polymérase I chez le type sauvage et le mutant *rad4Δ* est que chez ce dernier, la réparation est généralement plus faible dans tout l'ADNr, sauf le brin transcrit de la fraction active.

3.8. La chromatine récupère plus rapidement son état initial chez *rad4Δ* que chez le type sauvage pendant la NER

Une fois de plus, le photo-pontage au psoralène permet de savoir la distribution des gènes ribosomaux actifs et inactifs à un instant donné. Des noyaux de *rad4Δ* avant et après irradiation (réparé de 0 à 240 minutes) ont été photo-ponté, puis l'ADN a été extraite et digéré par EcoRI. Une migration sur gel d'agarose 1%, suivie d'un buvardage de type Southern et de

l'hybridation de la membrane avec une sonde d'ADNr nous permet de révéler les signaux ribosomiaux (Figure 13A). Ainsi, pour le mutant *rad4Δ*, tout comme les autres souches étudiées (figure 6), il y a présence de deux populations distinctes de gènes ribosomiaux avant (-UV) et immédiatement après irradiation (0); l'une retardée correspondant aux gènes actifs et l'autre moins retardée représentant les gènes inactifs (figure 13A). Or, après 30 minutes de réparation, la bande correspondant à l'actif ne disparaît que partiellement et au bout d'une heure seulement, on peut observer déjà une bande d'ADNr actif net en plus de la bande inactive. Néanmoins, des photopontages au psoralène de noyaux provenant de cellules 7,5 et 15 minutes après irradiation montrent la présence d'une accumulation de la fraction inactive surmontée d'une traînée, sans bande active distincte (données non montrées). La présence de 2 populations distinctes de gènes ribosomiaux est donc évidente à partir de une heure jusqu'à 4 heures de réparation (figure 13A), tandis que pour le type sauvage, le retour à deux populations ne se produit qu'après 2 heures de réparation. La quantification des pistes par ImageQuant permet d'avoir un aperçu graphique de ces résultats visuels et montre qu'à 30 minutes (figure 13B), la région correspondant à l'actif forme un plateau élevé par rapport aux graphiques 30 minutes et 1 heure du type sauvage de la figure 5B. Les graphiques *rad4Δ* montrent également la présence de deux populations dès 1 heure de réparation, confirmant l'interprétation visuelle de la figure 10A. Donc, chez la souche *rad4Δ*, la

chromatine ribosomale voit son état initial de deux populations (active et inactive) se rétablir plus rapidement que dans le type sauvage.

3.9. Malgré un retour rapide à deux populations d'ADNr et une réparation normale des CPD du brin transcrit de gènes actifs, la transcription ne reprend pas après une irradiation aux UV chez *rad4Δ*

Des cellules de *rad4Δ* des différents temps de réparation utilisés (-UV à 4 heures) ont été utilisés pour produire des noyaux. On a placé ces derniers dans des conditions permissives à l'élongation de la transcription (TRO), puis les ARN radiomarqués produits ont été extraits et utilisés comme sonde contre une membrane portant de l'ADNr fixé. La quantification des signaux ADN_r, puis leur normalisation par contrôle externe (HMGA) a permis de déterminer le taux d'élongation de transcription des ADN_r à chaque temps de réparation étudié par rapport à l'échantillon de noyaux non irradié (-UV), auquel nous attribuons la valeur arbitraire de 1. Alors qu'immédiatement après l'irradiation, il y a encore 75% de transcription, ce pourcentage diminue de manière graduelle tout au long de l'essai, allant même sous les 20% après 4 heures (figure 14, barres noires). Pendant ce temps, le type sauvage descend au minimum à 50% de transcription à 30 minutes de réparation, puis récupère entre 70 et 80% de sa transcription initiale après 4 heures (figure 14, barres grises). Ceci se produit malgré que la réparation du brin transcrit de la

fraction active soit très semblable entre *rad4Δ* et le type sauvage (comparez la figure 11 avec la figure 5). Ainsi, même si les conditions semblent favorables à un rétablissement de la transcription suite à une irradiation chez *rad4Δ*, on y observe une baisse continue de la transcription.

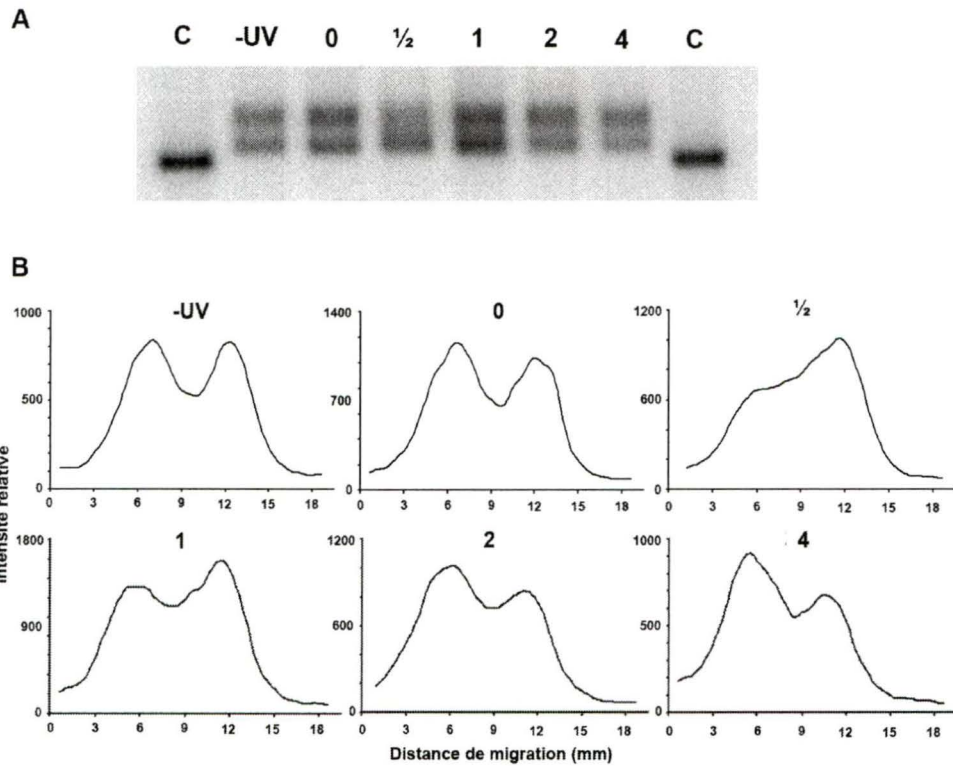


Figure 13 :A) Photo-pontage au psoralène de noyaux de cellules *rad4Δ* avant (-UV), après irradiation (temps 0) et pendant la réparation (1/2 à 4 heures). L'ADN des noyaux est digéré par EcoRI, puis migré sur gel d'agarose et buvardé à la Southern. Les gènes ribosomaux sont révélés par une sonde hybridant avec le fragment EcoRI d'une taille de 2,9kb.

- **B) Graphiques de l'intensité des signaux quantifiés par ImageQuant par rapport à la distance de migration en mm.** Le premier pic (lorsque présent) correspond à la fraction active, tandis que le deuxième pic correspond à la bande inactive.

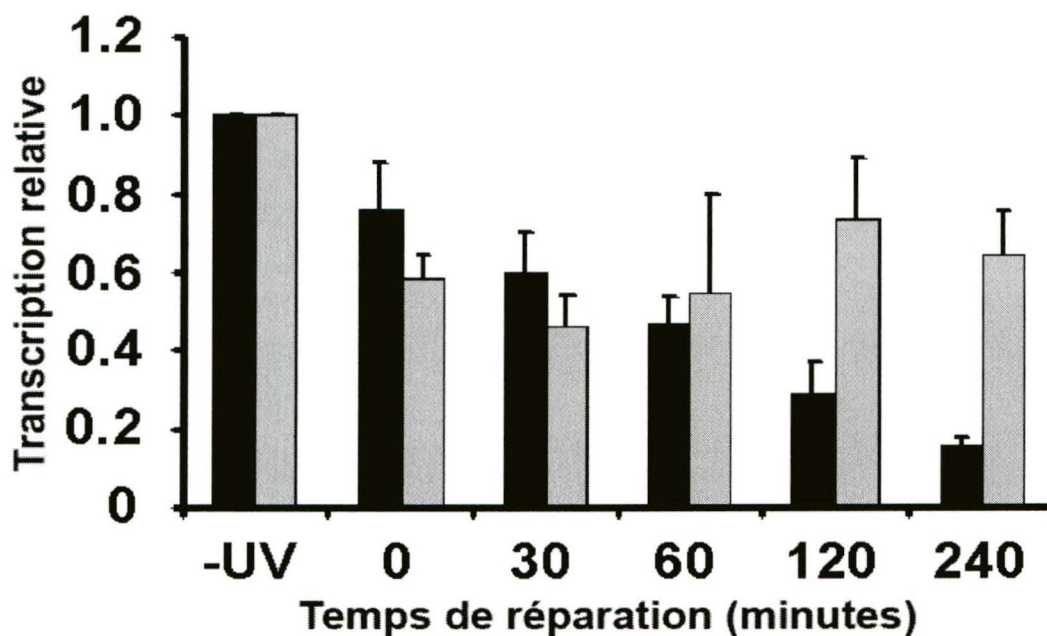


Figure 14 : Élongation de la transcription chez *rad4Δ* et le type sauvage. Des noyaux de chaque temps de réparation ont été mis en présence de conditions favorables à l'élongation de la transcription. L'extraction de ces ARN, puis l'utilisation de ce matériel comme sonde sur une membrane contenant des ADN_r fixés par SlotBlot permettent de quantifier l'élongation de la transcription ribosomale. L'utilisation d'un contrôle externe (HMGA) permet de normaliser les quantités d'ARN utilisées. Le type sauvage (en gris) est la moyenne de trois expériences indépendantes \pm écart type (voir figure 6), le mutant *rad4Δ* (en noir) est la moyenne de quatre expériences indépendantes \pm écart type.

4. Discussion

Les gènes ribosomaux de la levure se sont avérés un modèle avantageux pour l'étude de la structure de la chromatine active pendant la réparation par excision de nucléotides (NER). En effet, les ADNr actifs sont dénués de nucléosomes canoniques sur toute leur région codante de 6,9kb (CONCONI, 2005). En premier lieu, il a été montré que la réparation de CPD dans le brin non-transcrit des gènes ribosomaux actifs est plus rapide que dans les fractions inactives (tout brins confondus), ce qui est une indication que la NER répare plus rapidement les ADNr actifs que ceux étant inactifs. Néanmoins, ce résultat nous a amené à mieux comprendre par quels mécanismes la NER fonctionne dans de la chromatine ribosomale active.

Ainsi, la chromatine ribosomale a été étudiée à travers la NER de deux angles de vue différents. Premièrement, le photopontage au psoralène a permis de visualiser la structure chromatinienne de l'ADNr sur de longs fragments (2,9 kb). Deuxièmement, l'accessibilité à l'enzyme EcoRI sur des noyaux détecte l'état de la chromatine dans des régions ponctuelles de l'ADNr, c'est-à-dire aux sites de restriction. Malgré la différence de « cible » de ces deux méthodes, elles convergent pour indiquer que suivant une irradiation aux UV, il y a assemblage de la chromatine sur les régions actives des gènes ribosomaux et ce, même en absence de la NER. L'analyse de ces résultats nous porte à penser que l'inactivation de la chromatine ribosomale

est promue par la présence de dommages sur l'ADN. Un argument pouvant contrer cette hypothèse serait que le complexe de la NER lui-même provoque ces changements visibles par photo-pontage au psoralène et par accessibilité à EcoRI. Néanmoins, ces modulations sont observées en absence de la protéine de reconnaissance des dommages, Rad14, participant aux premières étapes de la NER et nécessaire au ciblage du complexe NER au dommage (PRAKASH et PRAKASH, 2000). Les mêmes résultats sont obtenus en absence de la protéine Rad1, pourtant impliquée dans l'incision en 5' du dommage, une des étapes initiales de la NER, et nécessaire pour l'assemblage correct du complexe NER au site du dommage (PRAKASH et PRAKASH, 2000). Un autre fait appuyant notre hypothèse est qu'à la dose utilisée (180J/m²), moins d'un CPD par mille paires de base a été introduit dans les fractions actives des gènes ribosomiaux. Considérant que l'empreinte DNase du complexe NER s'étend sur 30 nucléotides seulement autour du dommage (WAKASUGI et SANCAR, 1998), il serait étonnant qu'un seul complexe NER par 1kb ne provoque les changements de patron de psoralène ou les changements en accessibilité à EcoRI. De toute façon, jusqu'à présent, les nucléosomes sont la seule structure protéique capable d'interférer avec le psoralène sur l'ADN : les gros complexes protéiques impliqués dans la transcription et la réplication, ainsi que les protéines de régulation aux promoteurs, aux origines de réplication et dans les « enhancers » sont tous perméables au psoralène (SOGO et THOMA, 2003). Enfin, dans les conditions utilisées, il n'y a que de très faibles chances pour

qu'un dimère se forme sur un site de restriction à EcoRI. Malgré cela, l'accessibilité d'EcoRI aux régions actives diminue tôt pendant la NER dans le type sauvage et demeure basse dans les souches déficientes en NER. Ces résultats (le photo-pontage et l'accessibilité à EcoRI) suggèrent que la chromatine inactive pourrait s'étaler du site du dommage jusqu'aux régions d'ADN flanquantes, comme il a déjà été rapporté dans des études de réparation *in vitro* (GAILLARD *et al.*, 1997).

Il est possible que d'autres sous-produits d'une irradiation aux UV-C que les dimères, tels les glycols de thymine, amènent l'idée que d'autres voies de réparation, comme la BER, pourraient être la cause de l'inactivation de la chromatine active des ADNr dans notre étude. Par contre, la formation de produits d'oxydation (dont les glycols de thymine en sont un exemple) suivant une exposition aux UV-C, aux doses utilisées, est marginale, voire négligeable (CADET *et al.*, 2005). Récemment, il a été reporté que dans les cellules de mammifères la protéine p53 empêche l'accumulation de bris double brins aux fourches de réplication bloqué aux sites d'un dimère de pyrimidine (SQUIRES *et al.*, 2004). Il se pourrait donc que les bouts d'ADN lors de bris simple et double brins soient responsables de l'assemblage de la chromatine sur de l'ADNr actif. En effet, des expériences *in vitro* ont montré la déposition de nucléosomes dépendante de la réparation aux sites de bris simple brins (GAILLARD *et al.*, 1997). Par contre, non seulement les levures ne possèdent pas de protéine p53, mais de plus le système que l'on a utilisé

rend peu probable l'induction de bris double brins par irradiation aux UV-C. Donc, nous croyons que la présence seule de photoproduits induits par UV promeut, directement ou indirectement, l'assemblage de la chromatine sur les ADNr actifs.

Par l'essai d'élongation de la transcription (TRO), nous avons pu montrer que la présence de CPD diminue la transcription de l'ADNr. Il est connu que la présence d'un dimère sur le brin transcrit d'un gène transcrit provoque l'arrêt de l'ARN polymérase; chez *E.coli*, le complexe de transcription se dissocie dans une telle situation (SELBY et SANCAR, 1993). Aussi, bien qu'il ne soit pas sûr que des complexes ARN polymérase II ne se dissocie à la rencontre d'un dommage (REEDER, 1999), il a été montré que TRF2 (facteur de relâchement de la transcription) retire des ARN polymérases I et II bloquées au site d'un CPD (HARA *et al.*, 1999). Donc, le déplacement de l'ARN polymérase I pourrait expliquer l'inactivation de la chromatine ribosomale active. Or, le passage de la phase exponentielle de croissance à la phase stationnaire, quoique provoquant une baisse substantielle de la transcription, ne provoque pas de changements majeurs à la chromatine des gènes ribosomaux. Chez les eucaryotes supérieures, cette observation avait déjà été faite : la chromatine active des gènes ribosomaux y est maintenue en phase stationnaire et en métaphase, et on a expliqué ce phénomène par la présence d'ARN polymérase I ayant une progression

ralentie ou nulle empêchant la formation de nucléosomes sur l'ADNr (CONCONI *et al*, 1989).

D'un autre côté, l'étude de la réparation et de la chromatine des gènes ribosomiaux dans la souche *rad4Δ* nous amène à des résultats divergents. En effet, malgré que le brin transcrit des gènes ribosomiaux actifs soit réparé à près de 90% et que la chromatine ribosomiale retrouve un état actif/inactif après 1 heure, la transcription diminue continuellement pour la durée de l'expérience. Il peut pourtant y avoir des explications à ce constat, tous demandant à être prouvées. Premièrement, l'essai T4 endonucléase V permet d'évaluer la quantité de CPD présente dans un échantillon d'ADN à un temps (ou une situation) donné. Or, suite à une irradiation aux UV-C, les CPD sont le type de dommage majoritaire ($\approx 70\%$), mais non pas unique. En fait, les dimères 6-4 pyrimidine-pyrimidone (6-4 PD) compte pour environ 25% des dommages produits par une irradiation aux UV-C (PFEIFER *et al.*, 2005). Puisque l'enzyme T4 endonucléase V ne peut pas digérer ces 6-4 PD, son utilisation permet de détecter uniquement les CPD; il se pourrait que le mutant *rad4Δ* puisse ainsi réparer seulement les CPD des gènes ribosomiaux actifs et non pas les 6-4 PD. Néanmoins, il a été reporté que l'homologue de Rad4 chez l'humain (XPC) est responsable de la réparation préférentielle des CPD au détriment des 6-4 PD (EMMERT *et al.* 2000), enlevant du poids à cette hypothèse. Aussi, aux doses d'UV-C utilisées (180J/m^2), on s'attend à ce qu'il y ait moins d'un 6-4 PD par 3000 bases par brin, ce qui peut quand

même suffire à inhiber la transcription, considérant que le gène 35S est d'environ 6,9kb de long. Puisque l'enzyme UVDE (cloné de *Neurospora crassa*) est capable de digérer autant les CPD que les 6-4 PD, il est possible d'étudier la réparation spécifique des 6-4 PD en éliminant les CPD par photolyase, puis par digestion avec UVDE dans un essai similaire à celui de la T4 endonucléase V (TIJSTERMAN *et al.*, 1998). Il serait donc intéressant de vérifier la réparation des 6-4 PD dans le locus ribosomal du mutant *rad4Δ* de cette manière.

Deuxièmement, il se pourrait que les résultats obtenus reflète le fait que le mutant *rad4Δ*, quoique capable de réparer le brin transcrit des ADNr actifs, ne peut réparer les espaces intergéniques (portant les promoteurs les « enhancers » et les origines de réplication), inhibant ainsi l'initiation de la transcription. D'ailleurs, jusqu'à maintenant, nulle autre partie que le brin transcrit des ADNr ne pouvait être réparé dans un mutant *rad4Δ* (den DULK *et al.*, 2005). Dans la présente étude, nous distinguons dans *rad4Δ* une réparation de 50% du brin non transcrit de la fraction active et une faible (10-20%) réparation des fractions inactives (peu importe le brin), mais rien n'est connu sur la NER dans les espaces non transcrits des ADNr de ce mutant. Pour mieux connaître la réparation de cette région, l'utilisation d'une sonde d'ADNr différente permettrait de révéler un fragment EcoRI de 2,4kb correspondant aux espaces non transcrits. Ainsi, suite à un essai T4

endonucléase V, nous pourrions évaluer le taux de réparation de cette région dans le type sauvage et *rad4Δ*.

Autre phénomène imprévu : la chromatine des ADNr de *rad4Δ* pendant la NER semble se rétablir à son état initial plus rapidement que dans le type sauvage. Pourtant, dans d'autres mutants déficients en NER (*rad1Δ* et *rad14Δ*), aucun désassemblage de la chromatine n'est observé pendant la NER, mais en contrepartie aucune réparation ne s'y produit. En observant la réparation quasi complète du brin transcrit des fractions actives, nous pourrions s'attendre à ce que le désassemblage résulte du passage d'ARN polymérase I : or, la transcription ne reprend pas. Dans *rad4Δ*, il y a quand même assemblage de la chromatine suite à une irradiation UV, mais le rétablissement précoce dans cette souche semble indiquer que Rad4 favorise, de façon direct ou indirect, le maintien d'une chromatine fermée pendant la NER. Puisque les rôles que Rad4 peut jouer dans la NER ne sont pas bien connus, un lien entre cette protéine et les différentes composantes de remodelage ou de modification de la chromatine ne peut pas être exclu.

Enfin, notre hypothèse initiale que la réparation à 50% du brin transcrit des ADNr totaux soit due au fait que seule la fraction active, brin transcrit, soit réparée est seulement en partie vraie. En effet, nous observons une réparation quasi complète du brin transcrit de la fraction active, et les fractions inactives (peu importe le brin) sont peu réparé (entre 10 et 20%).

Néanmoins, le brin non-transcrit de la fraction active est quand même réparé à près de 50%, ce qui est inattendu compte tenu des résultats obtenus sur l'ADNr total. D'un autre côté, il n'est pas exclu qu'en l'absence de Rad4, une réparation normale des gènes ribosomiaux actifs peut se produire : le brin transcrit étant sujet à la TCR, mais pas le brin non transcrit. Ainsi, le contexte chromatinien des gènes ribosomiaux serait crucial pour la réparation de ce locus en l'absence de Rad4. D'autres investigations seront nécessaires pour clarifier et améliorer nos connaissances au sujet du rôle que joue Rad4 dans la réparation ribosomiale.

5. Conclusion

En résumé, il a été démontré qu'un assemblage de la chromatine indépendant de la NER se produit sur les gènes actifs de l'ADNr suite à une irradiation aux UV-C. L'ordre des événements entre l'arrêt de la transcription et l'assemblage de la chromatine n'est pas encore déterminé, mais les deux phénomènes sont reliés. Aussi, cet assemblage de la chromatine se produit très tôt suivant une irradiation aux UV-C. Ce processus se produit avant que la réparation de CPD ne soit détecté dans le type sauvage, allant dans la même direction que diverses observations montrant l'assemblage et la propagation de nucléosomes du site du dommage avant l'étape de synthèse de réparation (GAILLARD *et al.*, 1997). Récemment, l'observation qu'une hyperacétylation de H3 et du remodelage de chromatine se produit en quelques minutes dans le promoteur répressé MFA2 après irradiation aux UV et en absence de NER a été faite (YU *et al.*, 2005). Dans des mutants totalement déficients en excision (*rad1Δ*) ou en reconnaissance (*rad14Δ*) des dommages, il n'y a pas de désassemblage qui a lieu. À l'opposé, le mutant *rad4Δ*, dont la fonction exacte est inconnue, mais présentant aussi une grave déficience en NER, voit sa chromatine ribosomale se désassembler plus rapidement que chez le type sauvage. Dans tous ces cas, il n'y a pas de reprise de la transcription. Tous ces résultats indiquent que les nucléosomes ne sont en fait pas seulement un obstacle, mais pourrait aussi jouer un rôle actif dans la NER.

Bien que la réparation, la transcription et la chromatine des gènes ribosomaux pendant la NER dans une souche Rad4-déficiente ait été étudié, les fonctions exactes de cette protéine demeurent nébuleuses. Bien que peu probable, la modulation de la chromatine et la réparation caractéristiques d'un mutant *rad4Δ* vient peut-être de la perte de contact entre la voie de l'ubiquitine et la NER. Néanmoins, puisque des interactions ont été reportées entre XPA, RPA et XPC (l'homologue de Rad4 chez l'humain), et SWI/SNF (HARA et SANCAR, 2002), il reste à vérifier dans la levure si Rad4 a un rôle à jouer dans le recrutement et/ou l'activation de facteurs de remodelage ou de modification de la chromatine.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Antonio Conconi pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir enseigné lui-même les techniques inhérentes à notre discipline. Ce fut un plaisir de contribuer à démarrer un nouveau laboratoire tout en apprenant d'un expert de mon domaine d'étude. Je remercie également mes correcteurs, les Dr Darrell Hunting et Brendan Bell.

Je ne peux pas oublier mes collègues qui se sont ajoutés au fur et à mesure que ma maîtrise avançait. D'abord, merci à Maxime Tremblay pour les nombreux débats et conseils dont il a été l'initiateur, sans compter les nombreuses soirées tant essentielles pour le maintien du moral scientifique. Ensuite, je remercie Martin Toussaint pour avoir partagé son expérience scientifique : à plusieurs reprises, il a été une référence tant pour moi que pour les autres membres du laboratoire. Enfin, l'entrain et la passion contagieux de Geneviève Levasseur et sa capacité d'argumentation m'ont aidé tant sur les plans personnels que professionnels.

Aussi, mes remerciements vont à Mme Deirdre Fahy, dont la courte mais plaisante visite a permis l'apprentissage de techniques exotiques, ainsi que d'obtenir des conseils d'une experte. Le court mais enrichissant passage du Dr José Sogo, de par la profondeur des discussions au sujet de mon

projet, mérite également d'être mentionné. Je n'oublie pas les membres du département dans son ensemble, plus spécialement les membres du laboratoire des Dr Rancourt et Piché, pour l'aide apporté sous toutes ses formes (emprunts, conseils, etc.), ainsi que pour le climat de travail qu'ils ont rehaussé.

Enfin, je remercie les IRSC qui ont financé mon projet et le laboratoire.

Références

Araujo S.J, Wood R.D, 1999. Protein complexes in nucleotide excision repair, *Mutat. Res.* **435(1)**: 23-33.

Bardwell A.J, Bardwell L, Tomkinson A.E, Friedberg E.C, 1994. Specific cleavage of model recombination and repair intermediates by the yeast Rad1-Rad10 DNA endonuclease, *Science* **265**: 2082-2085.

Brown D.W, Libertini L.J, Suquet C, Small E.W, Smerdon M.J, 1993. Unfolding of nucleosome cores dramatically changes the distribution of ultraviolet photoproducts in DNA, *Biochemistry* **32**: 10527-10531.

Buschta-Hedayat N, Buterin T, Hess M.T, Missura M, Naegeli H, 1999. Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA, *PNAS* **96(11)**: 6090-6095.

Bucheli M, Sweder K, 2004. In UV-irradiated *Saccharomyces cerevisiae*, overexpression of Swi2/Snf2 family member Rad26 increase transcription-coupled repair and repair of non-transcribed strand, *Mol. Microbiol.* **52(6)**: 1653-1663.

Cadet J, Sage E, Douki T, 2005. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA, *Mutat. Res.* **571(1-2)** : 3-17.

Cech T, Pardue M.L, 1977. Cross-linking of DNA with trimethylpsoralen is a probe for chromatin structure, *Cell* **11(3)**: 631-640.

Citterio E, Vermeulen W, Hoeijmakers J.H, 2000. Transcriptional healing, *Cell* **101(5)** : 447-450.

Conconi A, 2005. The yeast rDNA locus: a model system to study DNA repair in chromatin, *DNA Repair* **4(8)** : 897-908.

Conconi A, Bespalov V.A, Smerdon M.J, 2002. Transcription-coupled repair in RNA polymerase I-transcribed genes of yeast, *PNAS* **99(2)** : 649-654.

Conconi A, Widmer R.M, Koller T, Sogo J.M, 1989. Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle, *Cell* **57(5)** :753-761.

Dammann R, Lucchini R, Sogo J.M, 1993. Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acid Res.* **21(10)** : 2331-2338.

Dammann R, Lucchini R, Sogo J.M, 1995. Transcription in the yeast rDNA gene locus : distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences, *Mol. Cell Biol.* **15** : 5294-5303.

den Dulk B, Brandsma J.A, Brouwer J, 2005. The Rad4 homologue YDR314C is essential for strand-specific repair of RNA polymerase I-transcribed rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Microbiol.* **56(6)** :1518-1526.

Emmert S, Kobayashi N, Khan S.G, Kraemer K.H, 2000. The xeroderma pigmentosum group C gene leads to selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers rather than 6-4 photoproducts, *PNAS* **97(5)** : 2151-2156.

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

Gaillard P.H, Martini E.M, Kaufman P.D, Stillman B, Moustacchi E, Almouzni G, 1996. Chromatin assembly coupled to DNA repair; a new role for chromatin assembly factor 1, *Cell* **86**: 887-896.

Gaillard P.H, Moggs J.G, Roche D.M, Quivy J.P, Becker P.B, Wood, R.D, Almouzni G, 1997. Initiation and bidirectional propagation of chromatin

assembly from a target site for nucleotide excision repair, *EMBO J.* **16(20)** : 6281-6289.

Gale J.M, Nissen K.A, Smerdon M.J, 1987. UV-induced formation of pyrimidine dimmers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10,3 bases, *PNAS* **84**: 6644-6648.

Gale J.M, Smerdon M.J, 1988. UV-induced pyrimidine dimers and trimethylpsoralen cross-links do not alter chromatin folding *in vitro*, *Biochemistry* **27(19)**: 7197-7205.

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

van Gool A.J, Verhage R, Swagemakers S.M, van de Putte P , Brouwer J, Troelstra C, Bootsma D, Hoeijmakers J.H, 1994. *RAD26*, the functional *S. cerevisiae* homolog of the Cockayne syndrome B gene *ERCC6*, *EMBO J.*, **13**: 5361–5369.

Green C.M, Almouzni G, 2002. When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics, *EMBO rep.* **3(1)** : 28-33.

Grunstein M, 1998. Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones, *Cell* **93**: 325-328.

Guzder S.N, Sung P, Prakash L, Prakash S, 1996. Nucleotide excision repair in yeast is mediated by sequential assembly of repair factors and not by a pre-assembled repairosome, *J. Biol. Chem.* **271(15)**: 8903-8910.

Guzder S.N, Sung P, Prakash L, Prakash S, 1998. Affinity of yeast nucleotide excision repair factor 2, consisting of the Rad4 and Rad23 proteins, for ultraviolet damaged DNA, *J. Biol. Chem.* **273(47)** : 31541-31546.

Habraken Y, Sung P, Prakash L, Prakash S, 1993. Yeast excision repair gene RAD2 encodes a single-stranded DNA endonuclease, *Nature* **366**: 365-368.

Hara, R, Selby C.P, Liu M, Price D.H, Sancar A, 1999. Human transcription release factor 2 dissociates RNA polymerases I and II stalled at a cyclobutane thymine dimer, *J. Biol. Chem.* **274(35)** : 24779-86.

Hennings W, 1999. Heterochromatin, *Chromosoma* **108**: 1-9.

Holmquist G.P, Maher V.M, 2002. The bypass of DNA lesions by DNA and RNA polymerases, *Mutat. Res.* **510(1-2)** : 1-7.

Jenuwein T, Allis C.D, 2001. Translating the histone code, *Science* **293(5532)**: 1074-1080.

Karumbati A.S, Deshpande R.A, Jilani A, Vance J.R, Ramotar D, Wilson T.E, 2003. The role of yeast DNA 3'-phosphatase Tpp1 and rad1/Rad10 endonuclease in processing spontaneous and induced base lesions, *J. Biol. Chem.* **278(33)**: 31434-31443.

Kim J.K, Patel D, Choi B.S, 1995. Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity, *Photochem. Photobiol* **62(1)**: 44-50.

Langst G, Becker P.B, 2004. Nucleosome remodelling: one mechanism, many phenomena, *Biochim. Biophys. Acta* **1677(1-3)**: 58-63.

Lommel L, Ortolan T, Chen L, Madura K, Sweder K.S, 2002. Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26 S proteasome, *Curr. Genet.* **42(1)** : 9-20.

Lucchini R, Sogo J.M, 1998. The dynamic structure of ribosomal RNA gene chromatin, Dans le livre "Transcription of ribosomal genes by eukaryotic RNA

polymerase I", Édité par M.R Paule, Springer-Verlag et R.G. Landes Company, 255-276.

Luger K, 2003. Structure and dynamic behaviour of nucleosomes, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**: 127-135.

Marzluff W.F, Huang R.C.C, 1985. Transcription of RNA in isolated nuclei, B.D. Hames et S.J. Higgins (ed.), *Transcription and Translation*, IRL Press, 89-129.

Mello J.A, Almouzni G, 2001. The ins and outs of nucleosome assembly, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11(2)** : 136-141.

Mellon I, Bohr V.A, Smith C.A, Hanawalt P.C, 1986. Preferential DNA repair of an active gene in human cells, *PNAS* **83**: 8878-8882.

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

Niggli H.J, Cerutti P.A, 1982. Nucleosomal distribution of thymine photodimers following far- and near ultraviolet irradiation, *Biochem. Biophys Res. Commun.* **105**: 1215-1223.

Parsons B.J, 1980. Psoralen photochemistry, *Photochem. Photobiol.* **32 (6)**: 813-821.

Pehrson J.R, 1995. Probing the conformation of nucleosome linker DNA *in situ* with pyrimidine dimer formation, *J. Biol. Chem.* **270(38)**: 22440-22444.

Pehrson J.R, Cohen L.H, 1992. Effects of DNA looping on pyrimidine dimer formation, *Nucl. Acids Res.* **20**: 1321-1324.

Pfeifer G.P, You Y.H, Besaratinia A, 2005. Mutations induced by ultraviolet light, *Mut. Res.* **571 (1-2)** : 19-31.

Planta R.J, 1997. Regulation of ribosome synthesis in yeast, *Yeast* **13(16)**: 1505-1518.

Powell N.G, Ferreiro J, Karabetsou N, Mellor J, Waters R, 2003. Transcription, nucleosome positioning and protein binding modulate nucleotide excision repair of the *Saccharomyces cerevisiae* MET17 promoter, *DNA Repair* **2(4)** : 375-386.

Prakash S, Prakash L, 2000. Nucleotide excision repair in yeast, *Mut. Res.* **451(1-2):**13-24.

Reeder R.H, 1999. Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates, *Prog. Nucleic Acid Res Mol Biol.* **62:** 293-327.

Rycyna R, Alderfer J, 1985. UV irradiation of nucleic acid: formation, purification and solution conformational analysis of the "6-4 lesion" of dTpdT, *Nucl.Acids. Res.* **13:** 5949-5963.

Schauber C, Chen L, Tongaonkar P, Vega I, Lambertson D, Potts W, Madura K, 1998. Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway, *Nature* **391(6668) :** 715-718.

Selby C.P, Drapkin R, Reinberg D, Sancar A, 1997. RNA-polymerase-II stalled at a thymine dimer - footprint and effect on excision-repair, *Nucl. Acids Res.* **25:** 787-793.

Selby C.P, Sancar A, 1993. Transcription-repair coupling and mutation frequency decline, *J.Bacteriol.* **175(23) :** 7509-7514.

Setlow R.B, Carrier W.L, 1966. Pyrimidine dimers in ultraviolet DNAs, J.Mol.Biol. **17** : 237-254.

Shihabara K, Stillman B, 1999. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF1-coupled inheritance of chromatin, Cell **96**: 575-585.

Smerdon M.J, Conconi A, 1999. Modulation of DNA damage and DNA repair in chromatin, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **62** :227-255.

Smerdon M.J, Lieberman M.W, 1978. Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA- repair synthesis, PNAS **75(9)** : 4238-4241.

Smith J.S, Caputo E, Boeke J.D, 1999. A genetic screen for ribosomal DNA silencing defects identifies multiple DNA replication and chromatin-modulating factors, Mol.Cell Biol. **19(4)** : 3184-3197.

Smith S, Stillman B, 1989. Purification and characterization of CAF-1, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication *in vitro*, Cell **58**: 15-25.

Sogo J.M, Thoma F, 2003. The structure of rDNA chromatin, M.O.J Olson (ed.), The Nucleolus, Kluwer Academic Plenum Publishers, pp.1-15.

Squires S, Coates J.A, Goldberg M, Toji L.H, Jackson S.P, Clarke D.J, Johnson R.T, 2004. p53 prevents the accumulation of double-strand DNA breaks at stalled-replication forks induced by UV in human cells, *Cell Cycle* **3(12)** : 1543-1557.

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

Sung P, Gudzer S.N, Prakash L, Prakash S, 1996. Reconstitution of TFIIH and requirement of its DNA helicase subunits, Rad3 and Rad25, in the incision step of nucleotide excision repair, *J. Biol. Chem.* **271**: 10821-10826.

Thoma F, 1999. Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair, *EMBO J.* **18(23)** : 6585-6598.

Tijsterman M, Verhoeven E.E, Jong J.G, Brouwer J, 1998. Enzymatic detection of ultraviolet-induced pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts at nucleotide resolution in *Saccharomyces cerevisiae*, *Anal. Biochem.* **260(1)** : 110-113.

Toussaint M, Levasseur G, Tremblay M, Paquette M, Conconi A, 2005. Psoralen photocrosslinking, a tool to study the chromatin structure of RNA polymerase I-transcribed ribosomal genes, *Biochem. Cell Biol.* **83**: 449-459.

Vance J.R, Wilson T.E, 2002. Yeast Tdp1 and Rad1-Rad10 function as redundant pathways for repairing Top1 replicative damage, *PNAS* **99(21)** : 13669-13674.

Verhage R.A, Zeeman A.M, de Groot N, Gleig F, Bang D.D, Van de Putte P, Brouwer J, 1994. The RAD7 and RAD16 genes, which are essential for pyrimidine dimer removal from the silent mating type loci, are also required for repair of the nontranscribed strand of an active gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* **14(9)** : 6135-6142.

Verhage R.A, Van de Putte P, Brouwer J, 1996. Repair of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: RAD4-independent strand-specific nucleotide excision repair of RNA polymerase I transcribed genes, *Nucleic Acid Res.* **24(6)** : 1020-1025.

Verreault A, 2000. *De novo* nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle, *Genes Dev.***14**: 1430-1438.

Wakasugi M, Sancar A, 1998. Assembly, subunit composition, and footprint of human DNA repair excision nuclease, PNAS **95(12)** : 6669-6674.

Warner J.R, 1989. Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*, Microbiol. Rev. **53(2)** : 256-271.

Wood R, Shivji M, 1997. Which DNA polymerases are used for DNA repair in eucaryotes, Carcinogenesis **18**: 605-610.

Woodcock C.L, Dimitrov S, 2001. Higher-order structure of chromatin and chromosome, Curr. Opin. Genet. Dev. **11(2)**: 130-135.

Yu Y, Teng Y, Liu H, Reed S.H, Waters R, 2005. UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus, PNAS **102** : 8650-8655.