

Université de Sherbrooke

Analyse de l'influence de la chromatine et de l'hétérochromatine
dans la réparation des dommages créés par les rayons UV dans
l'ADN chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Par

Martin Toussaint

Département de microbiologie et infectiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
philosophiae doctor (Ph.D.) en Microbiologie et infectiologie

12 Mars 2010

Dr Antonio Conconi, programme de microbiologie et infectiologie

Dr Darel Hunting, programme de radiobiologie et médecine nucléaire

Dr Benoit Chabot, programme de microbiologie et infectiologie

Dr Dindial Ramotar, Département de médecine et sciences médicales, Université de
Montréal



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-62831-7
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-62831-7

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.

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

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

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.

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

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


Canada

Résumé

Les rayons UV du soleil causent une variété de dommages dans l'ADN, parmi lesquels les dimères cyclobutylques de pyrimidines (CPD) sont considérés comme hautement toxiques et dommageables pour un organisme. Par conséquent, il est important de comprendre comment la machinerie de réparation par excision des nucléotides (la NER), assure la réparation *in vivo* des CPD présent dans l'ADN empaqueté sous forme de chromatine. Il est connu que la présence du nucléosome inhiberait la NER, mais les détails fonctionnels demeurent mal compris, de même que les mécanismes cellulaires nécessaires pour contourner cette inhibition offerte par la chromatine. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes *SIR* (*SIR1*, *SIR2*, *SIR3* et *SIR4*) permettent la formation d'une structure hétérochromatique sur le locus du type sexuel et les télomères. Cependant, l'impact de cette hétérochromatine sur la réparation des CPD est très peu étudié. Les travaux présentés dans cette thèse de doctorat ont permis de caractériser l'impact des gènes *SIR* dans la survie des cellules après irradiation aux rayons UV, de même que dans la réparation de l'ADN des régions hétérochromatiques. Premièrement, à l'aide d'une méthode basée sur le suivi de la croissance en milieu de culture liquide, nous avons démontré que les mutants *sirΔ* sont plus résistants aux rayons UV par rapport aux cellules de types sauvages. Ce phénotype serait relié à l'effet de pseudo-diploïdie présent dans ces mutants, et plus précisément à la recombinaison homologue en phase G2/M du cycle cellulaire. Les protéines Sir ne joueraient donc pas un rôle directement dans la réparation des CPD. Par la suite, nous avons procédé à l'analyse de la cinétique de réparation de l'ADN du locus du type sexuel et des télomères dans des cellules de type sauvage et des mutants *si2rΔ*, *sir3Δ*, et *rad26Δ*. À partir des résultats obtenus, nous avons pu tirer différentes conclusions préliminaires laissant croire que la présence de l'hétérochromatine faite par les protéines Sir n'inhiberait pas davantage la réparation par rapport à la présence des nucléosomes, du moins dans les régions sous-télomériques. De plus, nos résultats démontreraient que la réparation couplée à la transcription pourrait jouer un rôle important dans la réparation de ces régions. Ces hypothèses devront évidemment être testées.

Mots clés : Réparation de l'ADN, *Saccharomyces cerevisiae*, dimères cyclobutylque de pyrimidine (CPD), rayons UV, télomères, réparation par excision de nucléotide, recombinaison homologue.

Table des matières

Liste des illustrations (tableaux et figures).....	V
Liste des sigles, abréviations et symboles	IX
1 - Introduction	1
1.1 - L'ADN	1
1.2 - L'ADN est empaqueté sous forme de chromatine	2
1.2.1 - Structure de la chromatine	2
1.2.2 - Euchromatine vs hétérochromatine	4
1.2.3 - Chromatine répressive chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.2.3.1 – <i>Le locus du type sexuel chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>	6
1.2.3.2 – <i>Les télomères chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>	10
1.2.3.3 – <i>Rôle des gènes SIR</i>	15
1.3 - Les dommages dans l'ADN	17
1.3.1 - Sources et types de dommages	18
1.3.2 - Dommages créés par les rayons ultraviolets	20
1.3.3 - Formation des dommages créés par les UV dans un contexte de chromatine	26
1.4 - Les mécanismes de réparation de l'ADN	27
1.4.1 - Réparation des mésappariements : MMR (mismatch repair)	27
1.4.2 - Réparation par excision des bases : BER (base excision repair)	28
1.4.3 - Réparation des cassures d'ADN double brins : la recombinaison homologue et la NHEJ (non-homologous end-joining)	29
1.4.4 – La photoréversion des dommages créés par les UV	30
1.4.5 - Réparation par excision de nucléotides : NER (nucleotide excision repair)	31
1.4.6 - Entrecroisement des mécanismes de réparation	36
1.4.7 - Mécanisme de réparation de l'ADN dans un contexte de chromatine	38
1.4.7.1– <i>Réparation des CPD dans la chromatine</i>	38
1.4.7.2 – <i>Réparation des CPD dans l'hétérochromatine</i>	41

1.5. - Hypothèses et questions de recherche.....	42
1.5.1- Choix du modèle d'étude.....	43
2 - A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures.....	45
2.1 – Avant propos de l'article 1.....	45
2.2 – Résumé de l'article.....	47
2.3 – Article.....	49
3 – Differential participation of homologous recombination and nucleotide excision repair in yeast survival to ultraviolet light radiation.....	85
3.1 – Avant propos de l'article 2.....	85
3.2 – Résumé de l'article.....	87
3.3 – Article.....	89
4 – Analyse de la réparation de l'ADN dans les régions hétérochromatiques.....	125
4.1 – Matériel et méthodes.....	125
4.1.2 – Souches.....	125
4.1.3 – Analyse de la cinétique de réparation de l'ADN par l'endonucléase V du phage T4.....	125
4.1.3.1– Irradiation des cellules.....	125
4.1.3.2 – Extraction de l'ADN.....	126
4.1.3.3 – Digestion de l'ADN et traitement par l'endonucléase V du phage T4.....	130
4.1.3.4 – Buvardage de type Southern.....	131
4.1.3.5 – Quantification des signaux et de la cinétique de réparation.....	133
4.2 - Résultats.....	135
4.2.1 - Analyse de la cinétique de réparation des dommages créés par les UV dans l'ADN des régions hétérochromatiques.....	135
4.2.1.1 - Analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel dans les cellules de type sauvage.....	136
4.2.1.2 – Analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel dans les mutants sir2Δ.....	138
4.2.1.3 – Analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel dans les mutants sir3Δ.....	140

4.2.1.4– Analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel dans les mutants <i>rad26Δ</i>	142
4.2.2 – Analyse de la cinétique de réparation des dommages créés par les UV dans un fragment télomérique	144
4.2.2.1 – Analyse de la cinétique de réparation des dommages créés par les UV dans un fragment télomérique terminal de ~3kb	145
4.2.2.2 – Analyse de la cinétique de réparation des dommages créés par les UV le long des extrémités télomériques.....	147
4.2.2.3 – Analyse différentielle de la réparation des deux brins de l'ADN télomérique	148
5 – Discussion	151
5.1 – Criblage pour identifier des gènes affectant légèrement la survie des cellules irradiées aux rayons UV	151
5.1.1 – Suivi de la croissance des cellules en milieu liquide	153
5.1.2 – Mise au point et validation de la méthode pour l'analyse de la sensibilité des cellules de levure <i>S. cerevisiae</i> aux rayons UV.....	154
5.1.3 –Criblage dirigé pour identifier des gènes impliqués dans la modification de la chromatine affectant la récupération des levures <i>S. cerevisiae</i> après irradiation aux rayons UV.....	157
5.2 – Caractérisation du phénotype des mutants <i>sir2Δ</i> après irradiation aux rayons UV	159
5.2.1 – Tous les mutants <i>sirΔ</i> récupèrent plus rapidement que les cellules de type sauvage après une irradiation aux rayons UV.....	161
5.2.2 – L'effet de ploïdie est responsable de la récupération plus rapide des mutants <i>sirΔ</i> par rapport aux cellules de type sauvage après irradiation aux rayons UV.....	161
5.2.3 – La recombinaison homologue est responsable de la récupération plus rapide des mutants <i>sirΔ</i> par rapport aux cellules de type sauvage après irradiation aux rayons UV.....	163
5.2.4 – Les cellules en phase G2/M du cycle cellulaire récupèrent plus rapidement après une irradiation aux rayons UV, de façon dépendante de la recombinaison homologue et la NER.....	164
5.2.5 – Interaction de la NER et la recombinaison homologue en phase G2/M du cycle cellulaire pour permettre une réparation efficace des dommages créés par les UV; un modèle.....	166

5.3 – Étude de l’impact de l’hétérochromatine sur la réparation des dommages créés par les rayons UV	168
5.3.1 – Analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel	170
5.3.2 – Analyse de la cinétique de réparation des télomères	173
5.3.3 – Perspectives	176
6 – Remerciements	179
7 – Références	183

Liste des illustrations (tableaux et figures)

Figure 1 : Nucléotide et ADN

Figure 2 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN dans la chromatine

Figure 3 : Régulation de la transcription des gènes par les protéines du locus du type sexuel

Figure 4 : Construction de l'hétérochromatine au locus du type sexuel

Figure 5 : Construction de l'hétérochromatine des télomères chez *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 6 : Résumé des dommages et des systèmes de réparation

Figure 7 : Émission du soleil

Figure 8 : Formation des CPD dans l'ADN

Figure 9 : Mécanisme de recombinaison homologue

Figure 10 : Réparation par excision de nucléotides

Publication no.1

Tableau 1 : Strains used

Figure 1 : Calcul of growth parameters

Figure 2 : Acute exposure of WT, *rad9Δ*, *rad17Δ* and *rad52Δ* cells to MMS

Figure 3: Chronic exposure of WT, *rad9Δ*, *rad17Δ* and *rad52Δ* cells to MMS

Figure 4 : Chronic exposure of WT, *rad9Δ*, *rad17Δ* and *rad52Δ* cells to bleomycin

Figure 5 : Exposure of WT, *rad1Δ*, *rad7Δ*, *rad16Δ* and *rad26Δ* cells to UV irradiation

Figure 6 : Exposure of WT, *gcn5Δ*, *spt10Δ*, *sir2Δ* and *rpd3Δ* cells to UV irradiation

Publication no.2

Tableau 1 : Strains

Tableau 2 : Oligos

Figure 1 : Exposure of WT, *rad7Δ*, *sir1Δ*, *sir2Δ*, *sir3Δ*, and *sir4Δ* cells to UV irradiation

Figure 2 : Exposure of haploid, pseudo-diploid and diploid cells to UV irradiation

Figure 3 : Exposure of WT, *sir1Δ*, *sir2Δ*, *sir3Δ*, *sir4Δ*, *rad50Δ*, *rad52Δ*, *rad54Δ*, *rad26Δ* and *sirΔ radΔ* double mutants to UV irradiation

Figure 4 : non-synchronized, G2 synchronized and G1 synchronized WT cells to UV irradiation

Figure 5 : Exposure of non-synchronized and G2 synchronized HR and NER mutant cells

Figure 6 : Exposure of WT, *rad14Δ*, *rad7Δ*, *rad16Δ*, *rad26Δ*, *rad52Δ* and *rad54Δ* to UV irradiation

Figure 11 : Schéma de la méthode d'analyse de la cinétique de réparation des CPD par l'endonucléase V du phage T4.

Figure 12 : Analyse de la réparation du locus du type sexuel dans des cellules de type sauvage

Figure 13 : Analyse de la réparation du locus du type sexuel dans les mutants *sir2Δ*

Figure 14 : Analyse de la réparation du locus du type sexuel dans les mutants *sir3Δ*

Figure 15 : Comparaison de la réparation du locus du type sexuel dans des cellules de type sauvage par rapport aux mutants *sir2Δ* et *sir3Δ*.

Figure 16 : Analyse de la réparation du locus du type sexuel dans des mutants *rad26Δ*

Figure 17 : Analyse de la réparation d'un fragment télomérique de 3 kb

Figure 18 : Analyse de la réparation le long des extrémités télomériques

Figure 19 : Analyse différentielle de la réparation des deux brins d'un fragment télomérique de 3 kb dans des cellules de type sauvage

Figure 20 : Modèle résumant les résultats

Figure 21 : Comparaison de la réparation du brin C-riche et du brin G-riche avec la réparation des deux brins dans des cellules de type sauvage, et des mutants *rad26Δ*

Figure 22 : Pourcentage de transcription potentielle dans un fragment télomérique de 3 kb.

Tableau 1 : comparaison des gènes impliqués dans la NER chez la levure *S. cerevisiae* vs. Chez l'humain

Liste des sigles, abréviations et symboles

HML : hidden MAT left

HMR : hidden MAT right

ORC : Origin recognition complex

SIR : Silent information regulator

TERRA : Telomeric repeat-containing RNA

TPE : Telomere position effect

NHEJ : Non-homologous end-joining

MMS : Methyl-methane sulfonate

UV : Ultraviolet

IR : infrarouge

CPD : Cyclobutane pyrimidine dimers

6-4PP : Pyrimidine (6-4) pyrimidone

8-oxo-Guo : 8-oxo-7,8-dihydro-2' deoxyguanosine

MMR : Mismatch repair

BER : base excision repair

MRX : complexe de Mre11p, Rad50p et Xrs2p

NER : Nucleotide excision repair

GG-NER : global genomic nucleotide excision repair

TC-NER : Transcription coupled nucleotide excision repair

ATP : Adénosine triphosphate

YEPD : Yeast extract peptone dextrose

PBS : Phosphate buffer saline

NIB : Nuclei isolation buffer

RPM : Révolution par minute

TE : Tris-HCl-EDTA

HAT : Histone acétyl transférase

HDAC : Histone déacétylase

1 - Introduction

1.1 - L'ADN

L'ADN renferme l'information génétique des organismes vivants. L'élément de base d'une molécule d'ADN est le nucléotide, qui est construit d'un pentose, d'un groupement phosphate, et d'une des quatre bases azotées (figure 1A), soit adénine (A) et guanine (G) qui sont des purines, ou thymine (T) et cytosine (C) qui sont des pyrimidines. Les nucléotides sont rattachés les uns aux autres par des liaisons phosphodiester pour former une chaîne de nucléotides qui constitue un brin de l'ADN. Dans la double hélice d'ADN, deux chaînes de nucléotides sont retenues entre elles par des liaisons hydrogène qui s'établissent entre les atomes d'hydrogènes et d'azotes, ou, d'hydrogènes et d'oxygènes, des bases azotées des brins opposés, en respectant la complémentarité A:T et G:C (figure 1B).

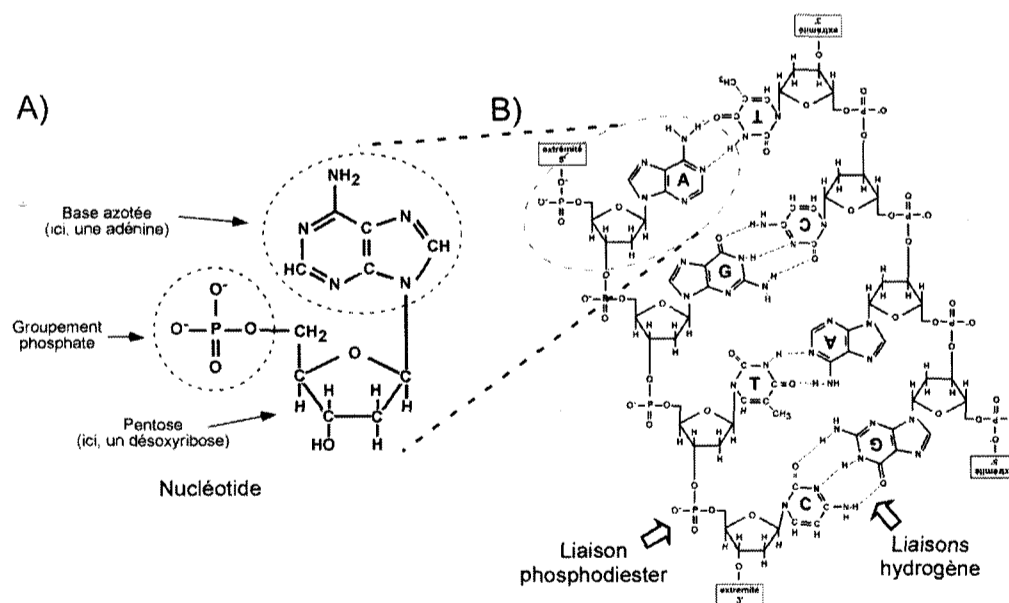


Figure 1 : Nucléotide et ADN (A) Un nucléotide est construit d'un groupement phosphate, d'un pentose, et d'une base azotée. (B) La double hélice d'ADN contient deux chaînes de nucléotides antiparallèles, où les nucléotides sont rattachés entre eux par des liaisons phosphodiester. Les deux polynucléotides sont retenus unis par des liaisons hydrogène. Tiré et adapté de BRODEUR et TOUSSAINT, 2007.

1.2 - L'ADN est empaqueté sous forme de chromatine

Pour pouvoir être contenu dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN doit être condensé environ 10 000 fois. En effet, l'ensemble de l'ADN d'une cellule humaine, placé bout à bout, s'étirerait sur près de deux mètres, alors que le noyau d'une cellule a un diamètre de cinq micromètres (5×10^{-6} m). Cette condensation de l'ADN est réussie grâce à la chromatine, qui représente une structure hautement conservée chez les eucaryotes. Voici en détail comment la chromatine permet différents niveaux de compaction de l'ADN dans une cellule.

1.2.1 - Structure de la chromatine

Chez les eucaryotes, la condensation de l'ADN est possible grâce à son association avec les histones H2A, H2B, H3 et H4, qui permettent la formation d'une structure extrêmement compacte, la chromatine. H2A et H2B s'associent pour former un hétérodimère H2A-H2B, tandis que deux copies de l'histone H3 et de l'histone H4 forment un hétérotétramère. Dans la chromatine, deux dimères H2A-H2B et un hétérotétramère H3-H4 s'assemblent en un octamère (huit sous-unités), autour duquel l'ADN s'enroule. L'ensemble constitué d'un octamère d'histones et de l'ADN l'encerclant se nomme nucléosome et constitue la sous-unité répétitive de la chromatine (figure 2). Dans chaque nucléosome, l'ADN forme 1,65 tour autour de l'octamère d'histones, ce qui implique environ 146 paires de bases. Le tétramère H3/H4 serait associé à environ 90 pb de l'ADN nucléosomal central, tandis que

chaque dimère H2A/H2B lierait environ 30 pb des extrémités de l'ADN nucléosomal (LUGER *et al.*, 1997). Chaque nucléosome est séparé de son voisin par de l'ADN libre, appelé ADN de liaison, qui varie en taille selon les organismes et les tissus. Chez les cellules de mammifères, l'ADN de liaison mesure entre 160 et 220 pb. La succession des nucléosomes avec l'ADN de liaison résulte en une structure baptisée collier de perles, qui possède un diamètre de 10 nm. Cependant, la fibre physiologique aurait un diamètre de 30 nm et compterait cinq à six nucléosomes par tour, résultat d'un degré supérieur d'enroulement des nucléosomes (THOMA *et al.*, 1979). Ce

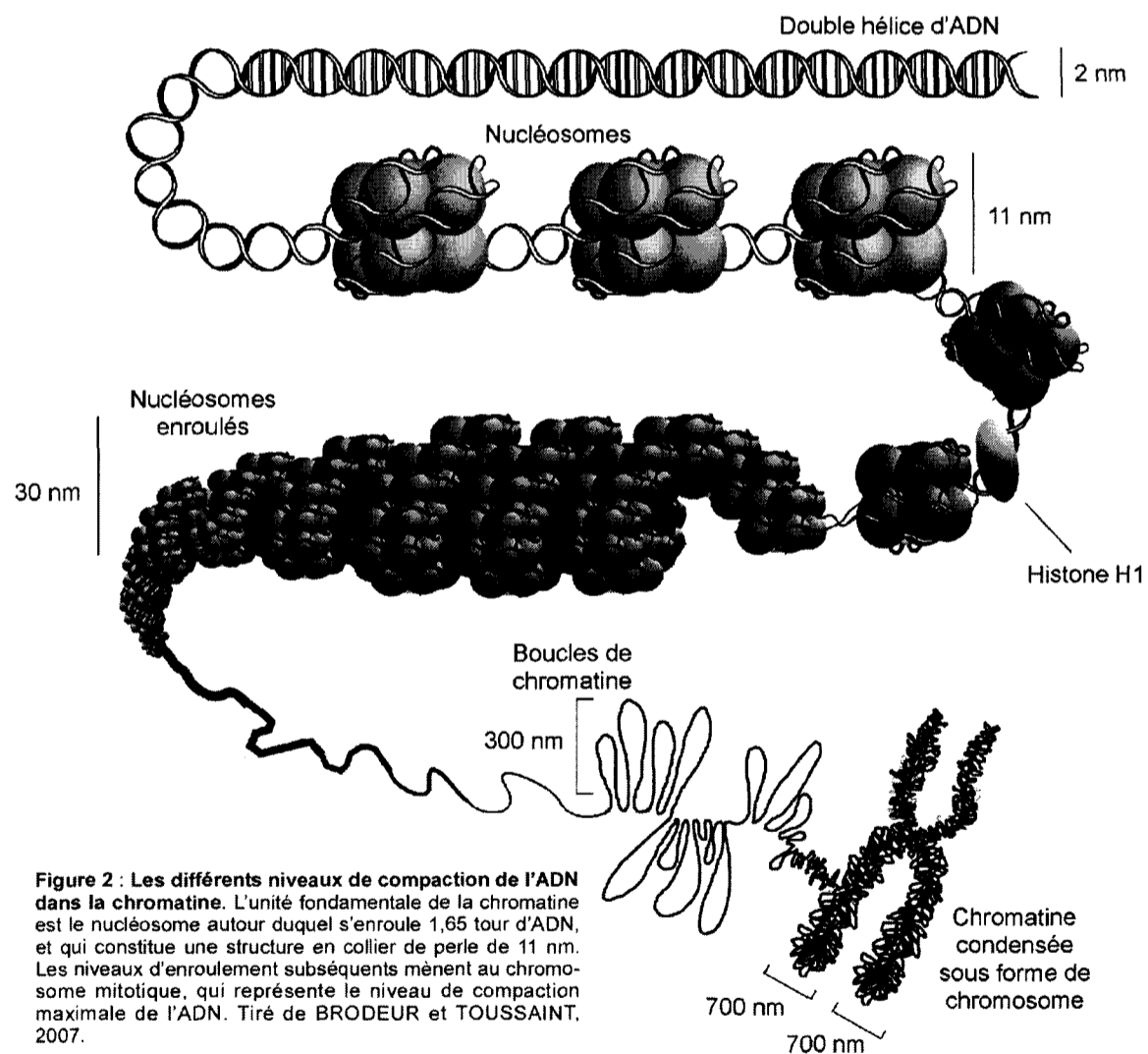


Figure 2 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN dans la chromatine. L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome autour duquel s'enroule 1,65 tour d'ADN, et qui constitue une structure en collier de perles de 11 nm. Les niveaux d'enroulement subséquents mènent au chromosome mitotique, qui représente le niveau de compaction maximale de l'ADN. Tiré de BRODEUR et TOUSSAINT, 2007.

niveau de compaction serait rendu possible grâce à l'histone H1, et ses variantes, qui s'attachent à l'ADN de liaison (HILL, 2001). Le plus haut degré de compaction est atteint au moment de la métaphase de la mitose. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, on retrouve un nucléosome à toutes les 165 pb, de sorte que l'ADN de liaison est beaucoup plus court en étant inférieur à 20 pb. De fait, la levure n'aurait pas d'histone de liaison H1, et ne présenterait potentiellement pas les niveaux de compactations supérieurs que l'on retrouve dans les organismes multicellulaires. Néanmoins, la levure possède des régions qui correspondent à la chromatine que l'on retrouve dans ces organismes plus complexes (GRUNSTEIN *et al.*, 1995). Étant donné la nature compacte de la chromatine, celle-ci devient généralement un obstacle très important pour tous les processus impliquant l'ADN, que ce soit la réplication, la transcription ou la réparation (CLAPIER et CAIRNS, 2009; LUGER *et al.*, 1997; MORRISON et SHEN, 2009; VAN ATTIKUM et GASSER, 2009). Les niveaux de compactations nécessaires pour que l'ADN soit contenu dans le noyau des cellules sont illustrés à la figure 2.

1.2.2 - Euchromatine vs hétérochromatine

Chez les eucaryotes supérieurs, la chromatine existe principalement sous deux formes, l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine correspond à la forme la moins condensée de chromatine, et est par conséquent permissive à la transcription. Il est cependant intéressant de noter que même la chromatine active en transcription est en fait 50 fois plus condensée que l'ADN nu (HORN et PETERSON, 2002). À l'opposé,

l'hétérochromatine correspond à une forme de chromatine hautement condensée. Historiquement, l'hétérochromatine a été identifiée en se basant sur des observations exclusivement histologiques, comme des segments de chromosomes qui apparaissent très condensés et très colorés dans le noyau interphasique. Cette structure condensée de chromatine se situe principalement aux séquences d'ADN hautement répétées tel que les microsatellites, les centromères et les télomères et joue différents rôles dont la répression de la transcription et de la recombinaison (GARTENBERG, 2009). La chromatine de la levure *S. cerevisiae* ne présente pas les mêmes caractéristiques histologiques que l'euchromatine et l'hétérochromatine des eucaryotes supérieurs, mais posséderait néanmoins des régions qui correspondent à ces différentes formes de chromatine (GRUNSTEIN *et al.*, 1995). Voici en détail en quoi consiste les régions du génome de la levure *S. cerevisiae* qui présentent des particularités se rapprochant de l'hétérochromatine des organismes multicellulaires.

1.2.3 - Chromatine répressive chez *Saccharomyces cerevisiae*

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il n'existe pas d'hétérochromatine clairement identifiée. Néanmoins, la chromatine qui est retrouvée au locus du type sexuel ainsi qu'aux télomères réprime la transcription des gènes endogènes, de même que des gènes qui y sont insérés artificiellement (APARICIO *et al.*, 1991; MILLAR et GRUNSTEIN, 2006; PIRROTTA et GROSS, 2005; RINE et HERSKOWITZ, 1987; RUSCHE *et al.*, 2003; TALBERT et HENIKOFF, 2006). Ainsi, les particularités de cette structure de chromatine chez la levure se rapprochent de l'hétérochromatine que

l'on retrouve chez les eucaryotes supérieurs (GREWAL et JIA, 2007; GRUNSTEIN *et al.*, 1995). Dans le but de faciliter la lecture de cette thèse, le terme hétérochromatine sera utilisé et fera référence à la structure de chromatine répressive que l'on retrouve au locus du type sexuel et aux télomères de la levure *S.cerevisiae*.

1.2.3.1 – Le locus du type sexuel chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Chez la levure *S. cerevisiae*, le type sexuel des cellules est dicté par le gène *MAT* situé sur le chromosome III, qui possède deux allèles différents; les allèles « *MATa* » et « *MAT α* ». Deux cellules haploïdes de type sexuel opposé « a » et « α » peuvent fusionner pour former une cellule diploïde « a/ α », qui à son tour peut entrer en méiose dans des conditions nutritionnelles restrictives pour former des spores haploïdes, ce qui confère un avantage évolutif à cet organisme. Les deux allèles « *MATa* » et « *MAT α* » diffèrent approximativement par 700 pb. L'allèle *MAT α* contient deux gènes, qui encodent les protéines *MAT α 1p* et *MAT α 2p*, d'une taille de 527 et 632 pb, respectivement. Dans une cellule de type sexuel « α » (figure 3A), le facteur de transcription constitutif *Mcm1p* travaille en association avec les protéines *MAT α 1p* et *MAT α 2p*. *Mcm1p* induit la transcription des gènes spécifiques aux cellules haploïdes, alors que l'association de *Mcm1p* avec *MAT α 1p* est impliquée dans l'activation d'une série de gènes spécifiques aux cellules « α » (BRUHN et SPRAGUE, 1994; HAGEN *et al.*, 1993). Finalement, l'association de *Mcm1p* avec *MAT α 2p* agit comme régulateur négatif de gènes spécifiques aux cellules « a » (figure 3A) (HERSCHBACH *et al.*, 1994; KELEHER *et al.*, 1989; PATTERTON et

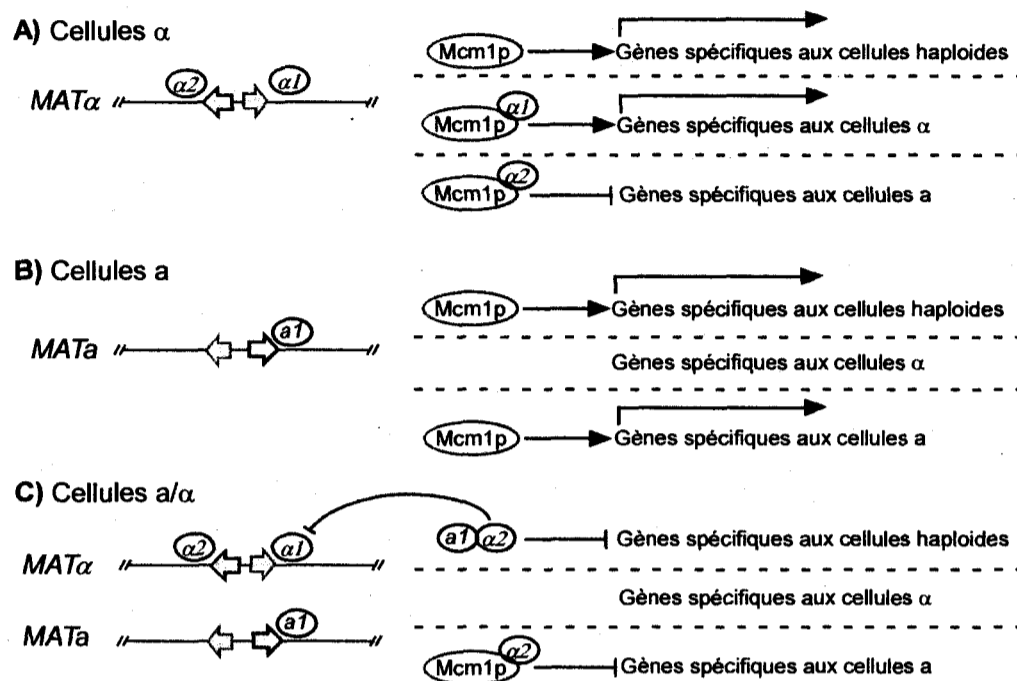
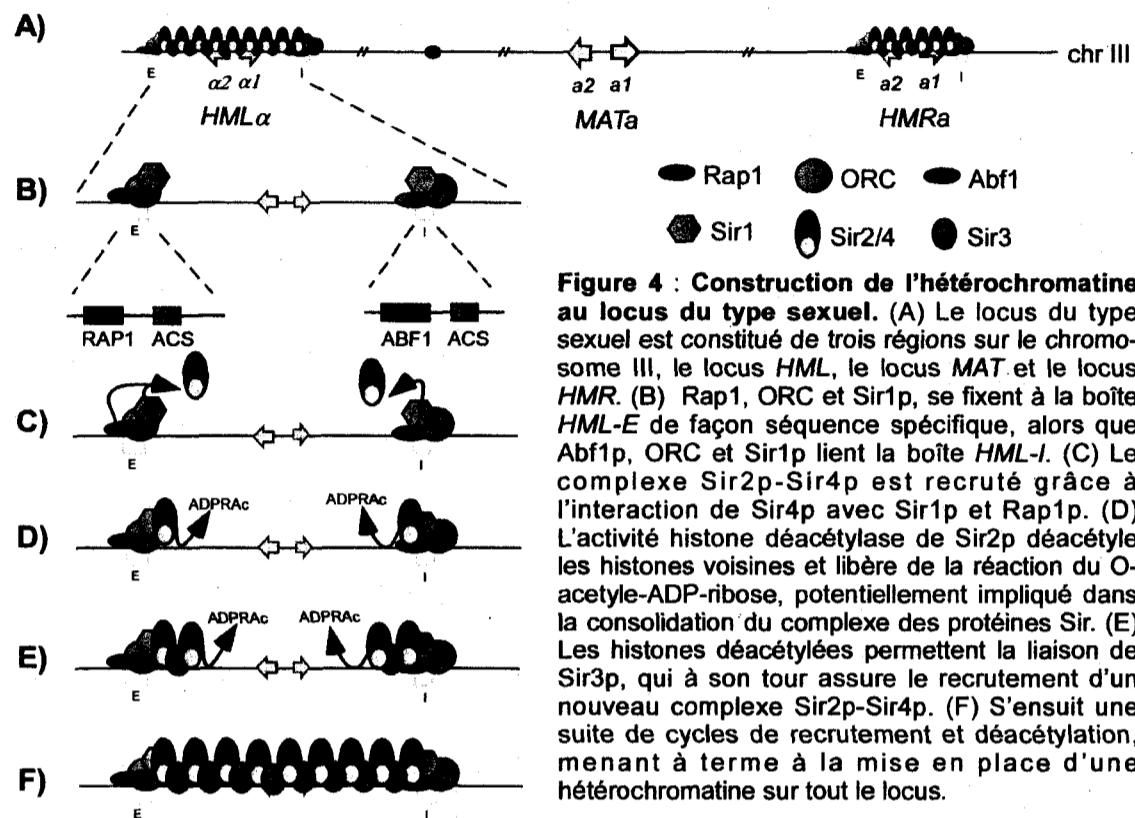


Figure 3 : Régulation de la transcription des gènes par les protéines du locus du type sexuel. (A) Régulation de la transcription dans les cellules haploïdes de type sexuel "α". (B) Régulation de la transcription dans les cellules haploïdes de type sexuel "a". (C) Régulation de la transcription dans les cellules diploïdes de type sexuel "a/α". Plus de détails sont présents directement dans le texte.

SIMPSON, 1994). L'allèle $MATa$ contient aussi deux gènes, $MATa1$ et $MATa2$, d'une taille de 486 et 845 pb, respectivement. Cependant, on accorde une fonction biologique seulement à la protéine $MATa1p$, qui n'aurait en fait aucun rôle dans les cellules haploïdes (TATCHELL *et al.*, 1981). Dans les cellules de type sexuel « a », $Mcm1p$ active l'expression des gènes spécifiques aux cellules « a » ainsi que les gènes spécifiques aux cellules haploïdes (figure 3B). Dans les cellules diploïdes (figure 3C), qui contiennent deux jeux de chromosomes complets, donc deux chromosomes III, les deux allèles « $MATa$ » et « $MAT\alpha$ » sont présents. L'association des protéines $MATa1p$ et $MAT\alpha 2p$ crée un inhibiteur qui réprime l'expression des gènes spécifiques aux cellules haploïdes, ainsi que l'expression du gène $MAT\alpha 1$ qui ne peut désormais activer l'expression des gènes spécifiques aux cellules « α » (GOUTTE et JOHNSON, 1988; JENSEN *et al.*, 1983; LI *et al.*, 1995; STRATHERN

et al., 1988). De plus, tel que dans une cellule haploïde « α », la présence de la protéine MAT α 2p réprime l'expression des gènes spécifiques aux cellules « a » (figure 3C). Ainsi, les protéines produites par les gènes du type sexuel contrôlent l'expression de plusieurs gènes, et modifient en conséquence le phénotype des cellules, et ce, peu importe le nombre réel de jeux de chromosomes. Par exemple, il est connu que les cellules diploïdes exprimant les deux types sexuels « a/ α » sont plus résistantes aux radiations ionisantes et montrent un taux de recombinaison spontanée entre deux allèles plus élevé que les cellules diploïdes exprimant un seul type sexuel (cellules diploïdes « a/a » ou « α/α ») (FRIIS et ROMAN, 1968; HEUDE et FABRE, 1993). Il faut aussi noter que ce mécanisme de régulation fait en sorte que lorsqu'aucun gène du type sexuel n'est exprimé, seule la protéine Mcm1p peut agir comme régulateur, conférant ainsi phénotype « a » aux cellules haploïdes (figure 3) (STRATHERN *et al.*, 1981).

Une cellule de levure haploïde d'un type sexuel donné peut changer son type sexuel, ce qui lui permet dès lors de fusionner avec une cellule de type sexuel opposé (revue dans HABER, 1998). Pour ce faire, chaque cellule doit posséder l'information génétique pour les deux types sexuels. De fait, en plus du locus *MAT*, le locus du type sexuel comprend la cassette *HMLa* (*hidden MAT left*) et la cassette *HMRa* (*hidden MAT right*) positionnées respectivement sur le bras gauche et droit du chromosome III (figure 4A) (revue dans HABER, 1998). Tel que mentionné précédemment, le locus *MAT* exprime des gènes, et possède par conséquent une forme de chromatine qualifiée comme accessible aux protéines agissant sur l'ADN. À l'inverse, pour éviter qu'une



cellule haploïde n'exprime les deux types sexuels, les loci *HML* et *HMR* sont empaquetés sous forme d'hétérochromatine, qui inhibe l'expression des gènes. L'établissement de cette hétérochromatine s'amorce sur des séquences initiatrices (*silencers* en anglais) qui bordent les loci *HML* et *HMR*. De fait, les boîtes *HML-E* et *HML-I* initient et délimitent la répression au locus *HML*, alors que les boîtes *HMR-E* et *HMR-I* bordent le locus *HMR* (figure 4A). Chacune de ces séquences consiste en des sites de liaison pour le complexe protéique ORC (*origin recognition complex*), et pour les protéines Rap1p ou Abf1p, ou les deux (figure 4B). À noter que la boîte *HMR-I* ne serait pas essentielle pour la mise en place de l'hétérochromatine du locus *HMR*, mais serait néanmoins importante jouant un rôle de support pour cette chromatine silencieuse (RIVIER *et al.*, 1999; RUSCHE *et al.*, 2002). En plus des nucléosomes, la composante structurelle de cette hétérochromatine comprend les

protéines Sir2p, Sir3p et Sir4p, produit des gènes *SIR* (*silent information regulator*) (revue dans HABER, 1998). De plus, une quatrième protéine Sir, Sir1p, participe aussi à l'initiation de l'assemblage de l'hétérochromatine à travers une interaction avec ORC et Sir4p (TRIOLO et STERNGLANZ, 1996). Voici, à titre d'exemple, les étapes menant à la formation de l'hétérochromatine du locus *HML* selon l'état des connaissances actuelles. Les protéines ORC, Abf1p, Rap1p et Sir1p se lient à leurs séquences cibles spécifiques sur l'ADN au locus *HML* et recrutent le dimère Sir2p-Sir4p (figure 4C). Sir2p, une protéine hautement conservée des archaebactéries à l'humain ayant une activité déacétylase dépendant du NAD (revue dans BLANDER et GUARENTE, 2004; MARMORSTEIN, 2004), déacétyle les queues des histones des nucléosomes voisins, principalement la lysine 16 de l'histone H4, fournissant ainsi un site de haute affinité pour la liaison de la protéine Sir3p (figure 4D). Cette réaction de déacétylation libère du O-acétyl-ADP-ribose, qui induirait un changement dans la conformation tridimensionnelle du complexe des protéines Sir, favorisant l'oligomérisation de Sir3p avec le complexe Sir2p-Sir4p (figure 4E) (MARTINO *et al.*, 2009). Plusieurs cycles itératifs de déacétylation/recrutement permettent au complexe Sir2p-Sir4p et à Sir3p de s'étendre le long du locus et constituer l'hétérochromatine (figure 4F) (revue dans RUSCHE *et al.*, 2003). De fait, il a été proposé que deux complexes Sir2p-Sir3p-Sir4p se lieraient pour trois nucléosomes, où le complexe protéique Sir pourrait agir comme pont entre deux nucléosomes (MARTINO *et al.*, 2009). La figure 4 décrit schématiquement les différentes étapes menant à l'assemblage de l'hétérochromatine du locus *HML*.

*1.2.3.2 - Les télomères chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.*

Les télomères constituent une structure nucléoprotéique (assemblage de protéines sur une séquence d'ADN) qui est située aux extrémités des chromosomes. Cette structure est très conservée à travers les espèces (CHAKHPARONIAN et WELLINGER, 2003; LINGER et PRICE, 2009). Les télomères jouent des rôles essentiels dans le maintien de l'intégrité du génome. En effet, ils permettent d'éviter que les extrémités des chromosomes soient reconnues comme des cassures d'ADN double brins ce qui pourrait induire les mécanismes de réparation, provoquer la fusion des chromosomes et mener à des événements d'aneuploïdies (p.ex. : PALM et DE LANGE, 2008). De plus, les télomères assurent la réplication complète des chromosomes (ARTANDI et DEPINHO; DENCHI, 2009; LIEW et NORBURY, 2009). En effet, la télomérase, une ribonucléoprotéine, permet l'ajout de séquences télomériques aux extrémités des chromosomes pour compenser les pertes provoquées par le problème de réplication des extrémités (LUE) Epub 2009). Chez l'humain, la télomérase est active seulement dans les premières semaines de l'embryogénèse dans les cellules souches et dans les cellules sexuelles (ULANER et GIUDICE, 1997). Chez la plupart des eucaryotes, les télomères sont composés de séquences répétées riches en guanines pour le brin se terminant en 3', appelé le brin G-riche, et un brin riche en cytosines, le brin C-riche se terminant en 5'. Le brin G-riche sert de matrice pour la synthèse du brin retardé lors de la réplication des chromosomes et s'étend par conséquent au-delà du brin C-riche, formant une extrémité simple brin (CHAKHPARONIAN et WELLINGER, 2003; LIEW et NORBURY, 2009).

La levure *S.cerevisiae* contient 16 chromosomes, donc 32 télomères. Dans cet organisme, le brin G-riche des télomères est composé de séquences TG₁₋₃ répétées, alors que le brin C-riche complémentaire est composé de séquences C₁₋₃A (CHAKHPARONIAN et WELLINGER, 2003). Dans les régions sous-télomériques, deux types de séquences sont fréquemment retrouvées associées aux répétitions télomériques; les séquences « X » et « Y' » (CHAN et TYE, 1983). Deux types de séquences « Y' » sont connues : les Y' courts mesurant 5,2 kb, et les Y' longs mesurant 6,7 kb (CHAN et TYE, 1983; HOROWITZ *et al.*, 1984; LOUIS et HABER, 1990; LOUIS et HABER, 1992). Ces séquences sont présentes en un nombre de copies variables, allant de zéro à quatre copies. De fait, seulement environ la moitié des télomères possèdent des séquences Y' (CHAN et TYE, 1983; LOUIS et HABER, 1990). En principe, on ne retrouve pas de combinaisons entre les Y' courts et les Y' longs lorsque plusieurs copies de la séquence Y' sont présentes sur un télomère (LOUIS et HABER, 1990). La séquence des répétitions Y' est bien conservée entre les souches de *S. cerevisiae*, mais le nombre de copies, ainsi que leurs positions est hautement polymorphique (CHAN et TYE, 1983; HOROWITZ *et al.*, 1984; LOUIS et HABER, 1990). Les séquences Y' encodent une protéine ayant des propriétés d'hélicases, qui jouerait un rôle entre autres dans les souches de levures survivantes en absence de télomérase (LOUIS et HABER, 1992; YAMADA *et al.*, 1998). Pour leur part, les séquences « X » sont présentes sur tous les chromosomes. Ces éléments se positionnent normalement du côté centromérique des séquences Y', et sont

généralement moins conservés en ce qui a trait à la séquence et la taille entre les souches de *S. cerevisiae* (LOUIS *et al.*, 1994).

La formation de la chromatine silencieuse aux télomères montre quelques différences par rapport au locus du type sexuel. De fait, les séquences initiatrices de la formation de l'hétérochromatine sont différentes et sont composées de sites de liaisons de la protéine Rap1p et de l'hétérodimère KU que constituent les répétitions télomériques TG₁₋₃. Malgré cette différence, le rôle de cette séquence demeure le même, soit de recruter le complexe de protéines Sir et d'initier la formation de l'hétérochromatine. Les régions sous-télomériques sont d'abord empaquetées sous forme de nucléosomes. Cependant, ces nucléosomes montrent des différences importantes par rapport au reste du génome. En effet, les régions sous-télomériques sont résistantes *in vivo* à la méthylase dam et les queues des histones H3 et H4 sont hypoacétylées, suggérant que l'ADN sous-télomérique est moins accessible et par conséquent plus compact que le reste de la chromatine (BRAUNSTEIN *et al.*, 1993; DE BRUIN *et al.*, 2000; GOTTSCHLING, 1992; MONSON *et al.*, 1997). Ainsi, le modèle actuel de la répression télomérique décrit que Rap1p et l'hétérodimère KU lient directement les séquences télomériques (figure 5A). Par la suite, l'interaction entre l'hétérodimère KU et Sir4p permet le recrutement du dimère Sir2p-Sir4p (figure 5B). L'activité déacétylase de Sir2p déacétyle les queues des histones des nucléosomes des régions sous-télomériques, principalement la lysine 16 de l'histone H4, fournissant un site de haute affinité pour la protéine Sir3p. De plus, cette réaction libère du O-acétyle-ADP-ribose, qui favoriserait l'oligomérisation de la protéine Sir3p dans un complexe de

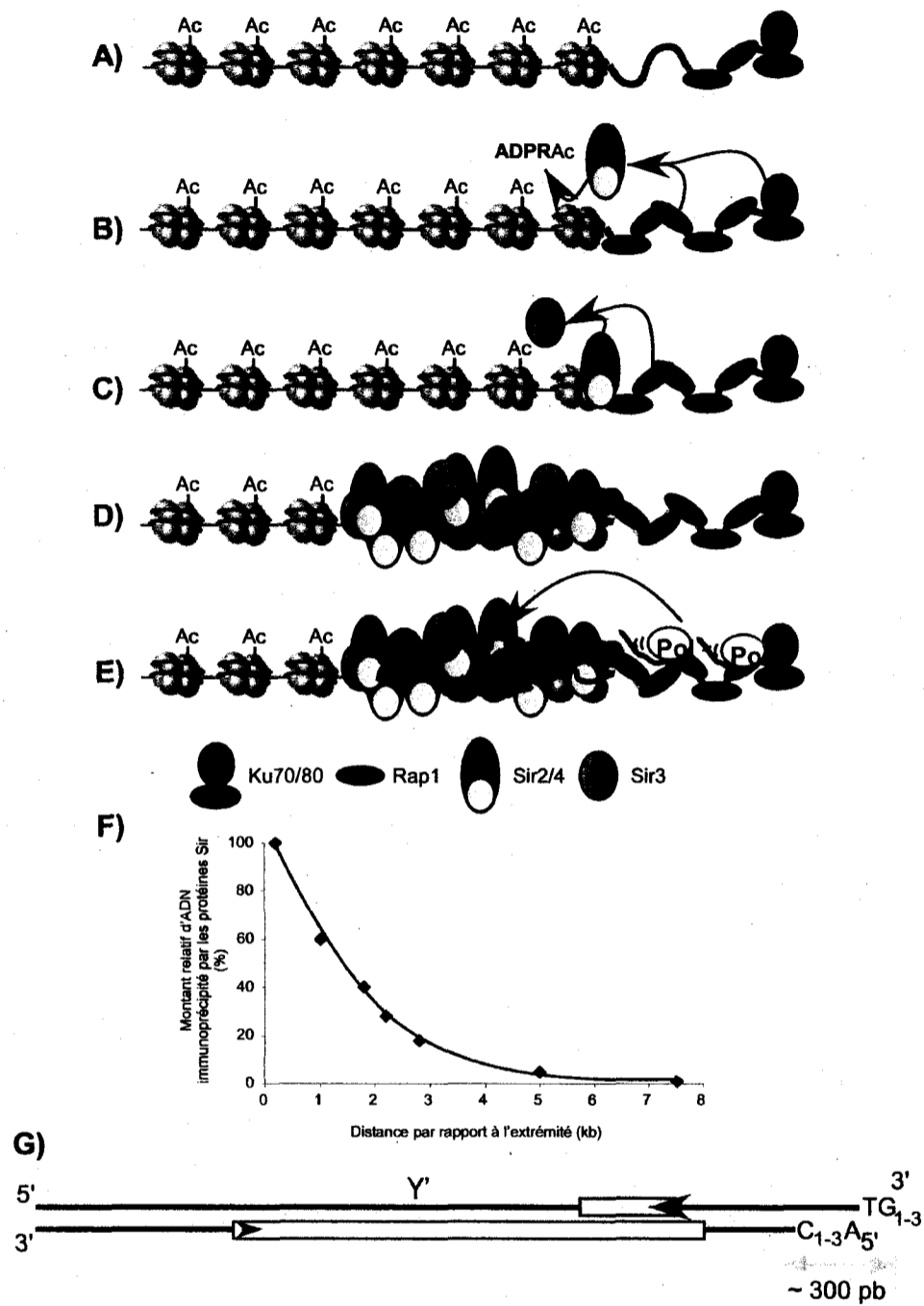


Figure 5 : Construction de l'hétérochromatine des télomères chez la levure *S.cerevisiae*. (A) L'hétérodimère Ku et Rap1p se fixent sur les répétitions télomériques et (B) recrute le dimère Sir2p-Sir4p. L'activité déacétylase de Sir2p déacétyle les queues des histones voisines. (C) Ceci crée un site de haute affinité pour la protéine Sir3p. (D) Des cycles de recrutement et déacétylation permet au protéines Sir de s'étendre vers l'intérieur des chromosomes. (E) La transcription dans les répétitions télomériques créait des courts ARN impliqués dans la formation de l'hétérochromatine des télomères. (F) Les protéines Sir s'étendent de l'extrémité des télomères vers l'intérieur des chromosomes en quantité décroissante. Tiré et adapté de STRAHL-BOLSINGER et al., 1997. (G) Représentation schématique d'un télomère. La boîte grise représente la séquence Y', alors que les boîtes rouge et bleu représentent des ORF hypothétiques inclus dans la séquence Y'.

protéines Sir sur les nucléosomes (figure 5C) (MARTINO *et al.*, 2009). Comme pour le locus du type sexuel, plusieurs cycles itératifs de déacétylation/recrutement permettent au complexe Sir2p-Sir4p et à la protéine Sir3p de s'étendre le long des télomères et constituer l'hétérochromatine télomérique (figure 5D) (HOPPE *et al.*, 2002; LUO *et al.*, 2002; RUDNER *et al.*, 2005; RUSCHE *et al.*, 2002; TANNY *et al.*, 2004). De fait, les protéines Sir seraient présentes en quantité décroissante de l'extrémité des télomères vers le centromère, où l'on retrouve à 3 kb de l'extrémité environ 20 % des protéines Sir2p, Sir3p et Sir4p, en quantité relative par rapport à la quantité retrouvée à 0,5 kb de l'extrémité (figure 5F) (STRAHL-BOLSINGER *et al.*, 1997). Par ailleurs, une série d'analyses récentes ont identifié des ARN comme constituants à part entière de l'hétérochromatine télomérique chez les cellules de mammifères et les levures (figure 5E). Ces ARN sont nommés TERRA pour *telomeric repeat-containing RNA*, et seraient produits par transcription à l'intérieur des séquences télomériques (AZZALIN *et al.*, 2007; LUKE *et al.*, 2008; SCHOEFTNER et BLASCO, 2008). La présence de cette hétérochromatine télomérique forme une structure qui protégerait les extrémités des chromosomes, et qui aurait comme conséquence d'inhiber l'expression des gènes insérés artificiellement dans les régions sous-télomériques, ce qui est décrit comme le TPE (*telomere position effect*) (CRAVEN et PETES, 2000; GOTTSCHLING *et al.*, 1990; PRYDE et LOUIS, 1999). En résumé, l'hétérochromatine télomérique serait formée par un ensemble des protéines qui lient directement les répétitions télomériques, en plus de la chromatine qui compacte l'ADN des régions sous-télomériques sous forme

de nucléosomes, sur lesquels s'ajoutent les protéines Sir dans une super-structure supplémentaire.

1.2.3.3 – Rôle des gènes *SIR*.

Tel que discuté précédemment, le produit des gènes *SIR* est impliqué dans la formation de l'hétérochromatine du locus du type sexuel et des télomères. Ainsi, la délétion des gènes *SIR* a comme principal effet la perte de cette hétérochromatine et par conséquent l'absence de l'inhibition de l'expression des gènes des loci *HML* et *HMR* (HABER, 1998; RINE et HERSKOWITZ, 1987), de même que la perte du TPE (APARICIO *et al.*, 1991). Par ailleurs, des modifications autres que la délétion des gènes *SIR*, mais qui affectent le recrutement des protéines codées par ces gènes sur les nucléosomes ont aussi pour effet la perte de l'inhibition transcriptionnelle faite par l'hétérochromatine au locus *HML* et *HMR* et la perte du TPE aux télomères (HECHT *et al.*, 1995; KYRION *et al.*, 1992; KYRION *et al.*, 1993; STAVENHAGEN et ZAKIAN, 1994). La perte de l'hétérochromatine aux loci *HML* et *HMR* provoque l'expression des gènes résidents *MATa* et *MAT α* , responsables des types sexuels « a » et « α », respectivement. On qualifie alors les mutants *sir Δ* de cellules pseudo-diploïdes. En effet, bien que ces mutants soient dans les faits haploïdes (ils possèdent un seul jeu de chromosomes), ils se comportent comme des cellules diploïdes à la suite de l'expression des deux types sexuels.

Plusieurs études montrent l'impact d'un changement du statut du type sexuel sur le phénotype des cellules, entre autres sur les capacités de réparation de l'ADN. Par exemple, le promoteur du gène *NEJ1*, impliqué dans la réparation des extrémités non-homologues (NHEJ, voir section 1.4.3 pour plus de détail sur la réparation de l'ADN), contient un site de liaison pour le répresseur MAT α 1p/MAT α 2p. En présence de ce répresseur, donc dans les cellules exprimant les deux types sexuels, l'expression du gène *NEJ1* est inhibée, diminuant l'implication du NHEJ dans les mécanismes de réparation des cassures d'ADN double brins, au profit de la recombinaison homologue. Cette régulation s'explique par le fait que dans les cellules diploïdes, il existe une deuxième copie de chaque chromosome. Il est donc préférable d'inhiber les mécanismes de réparations n'utilisant pas l'homologie tel que le NHEJ, et prioriser la réparation avec homologie, qui est beaucoup plus fiable en terme de conservation de l'information génétique. (ASTROM *et al.*, 1999; KEGEL *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 1999). Par ailleurs, cette priorisation de la recombinaison homologue dans les cellules exprimant les deux types sexuels pourrait aussi expliquer que les cellules « a/a » sont plus résistantes aux radiations ionisantes et au méthyl-méthane sulfonate (MMS), et augmente globalement la recombinaison homologue par rapport aux cellules « a/a » (FASULLO *et al.*, 1999; FASULLO et DAVE, 1994; FRIIS et ROMAN, 1968; HEUDE et FABRE, 1993; HOPPER *et al.*, 1975; KUNZ et HAYNES, 1981; LEE *et al.*, 1999; LEMONTT, 1980; LIVI et MACKAY, 1980; MORTIMER, 1958).

En outre, d'autres données montrent que les protéines Sir2p, Sir3p et Sir4p pourraient potentiellement être impliquées dans la réparation de l'ADN, dont les cassures

d'ADN double brins. En effet, ces protéines seraient transloquées des télomères vers les cassures d'ADN double brins à la suite d'une induction de dommages. (MARTIN *et al.*, 1999; MILLS *et al.*, 1999; TAMBURINI et TYLER, 2005). De plus, les protéines Sir joueraient aussi un rôle, quoique mineur, pour faciliter la réparation des cassures d'ADN double brins par NHEJ (LEE *et al.*, 1999). En somme, le rôle des protéines Sir dans la réparation de l'ADN demeurent un sujet à explorer.

1.3 - Les dommages à l'ADN

Le maintien de l'intégrité physique et chimique de l'ADN est essentiel à la vie. En effet, un dommage présent dans la molécule d'ADN risque de bloquer la progression des polymérase lors de la réplication et de la transcription de l'ADN, empêchant respectivement la division cellulaire et la transcription des gènes en ARN, nécessaire à la synthèse protéique, la catalyse de réactions biochimiques et la régulation de diverses voies métaboliques (HOEIJMAKERS, 2001; HOEIJMAKERS, 2009; JACKSON et BARTEK, 2009). En absence de réparation, ou dans les cas de réparations aberrantes, les dommages présents dans l'ADN peuvent mener à l'apparition de mutations et la création de réarrangements chromosomiques importants, qui peuvent tout deux induire l'apparition de cancer dans les organismes multicellulaires ou éventuellement provoquer la mort cellulaire (HOEIJMAKERS, 2001; HOEIJMAKERS, 2009; JACKSON et BARTEK, 2009). Dans les prochaines sections, nous allons discuter des différents types de dommage qui peuvent survenir

dans l'ADN et des sources associées, en apportant plus de détails sur les dommages créés par les rayons ultraviolets du soleil.

1.3.1 - Sources et types de dommage à l'ADN

En moyenne, l'ADN d'une cellule du corps humain peut subir jusqu'à 100 000 dommages de toutes sortes en une journée (HOEIJMAKERS, 2009; JACKSON et BARTEK, 2009; LINDAHL, 1993). Ces dommages peuvent être d'origine intra ou extracellulaire. Parmi les sources de dommages intrinsèques aux cellules, on retrouve : 1-les erreurs spontanées de la réplication de l'ADN qui peuvent causer l'introduction de boucle d'insertion ou de délétion, ainsi que l'ajout de mauvaises bases menant à un mésappariement dans la molécule d'ADN (KUNKEL et ERIE, 2005); 2- l'instabilité chimique des bases, où certains liens chimiques de l'ADN ont tendance à se désintégrer spontanément dans les conditions physiologiques (p.ex. : l'hydrolyse de nucléotides laisse des sites abasiques non-instructifs dans l'ADN, et la déamination spontanée des cytosines, adénines et guanines converties ces bases en uracile, hypoxanthine, et xanthine non codantes, respectivement) (HOEIJMAKERS, 2001; LINDAHL, 1993; SANDER *et al.*, 2005); et 3- les produits du métabolisme cellulaire normal de la cellule qui constituent une menace constante pour l'intégrité de l'ADN, ce qui inclut les ROS (*reactive oxygen species*), dont les anions superoxydes, les radicaux hydroxyls et le peroxide d'hydrogène dérivés de la respiration cellulaire et de la peroxidation des lipides. D'ailleurs, au delà de 100 modifications oxidatives ont été identifiées dans l'ADN (CADET *et al.*, 1997; KAWANISHI *et al.*, 2006). À

l'inverse, les dommages peuvent être induits par des agents physiques ou chimiques d'origine externe à la cellule, dont voici trois cas typiques : 1- Les radiations ionisantes, comme les rayons X reçus lors d'un examen radiologique conventionnel, causent des bris simples et double brins dans la molécule d'ADN (WARD, 1988); 2- les produits de combustion de la cigarette causent l'ajout de groupements chimiques aux bases de l'ADN (p.ex. : (GODSCHALK *et al.*, 1998; ZHAO *et al.*, 1997); et 3- les rayons ultraviolets (UV) du soleil modifient les liaisons entre les bases ou ajoutent des groupements chimiques à la molécule (CADET *et al.*, 2005; RAVANAT *et al.*, 2001).

Toutes ces causes, d'origine interne ou externe, provoquent en premier lieu divers types de dommages à l'ADN, qui risquent par la suite de bloquer la progression de la fourche de réplication ou la transcription, menant à la formation secondaire de bris simple brin de la molécule d'ADN, et dans certains cas, à des cassures complètes des deux brins de la molécule (LETTIER *et al.*, 2006). Bien que ces cassures d'ADN double brins ne surviennent pas fréquemment, elles sont néanmoins considérées comme les dommages les plus complexes à réparer, ainsi que les plus toxiques pour une cellule (KHANNA et JACKSON, 2001). À l'inverse, les rayons UV constituent l'une des causes les plus importantes de dommages induits dans l'ADN. En effet, une journée d'exposition au soleil peut produire jusqu'à 100 000 dommages à l'ADN dans un seul kératinocyte (HOEIJMAKERS, 2009; JACKSON et BARTEK, 2009). La figure 6 présente un survol résumant les différentes sources de dommages en lien avec les types de lésions causées dans l'ADN et les mécanismes de réparation associés.

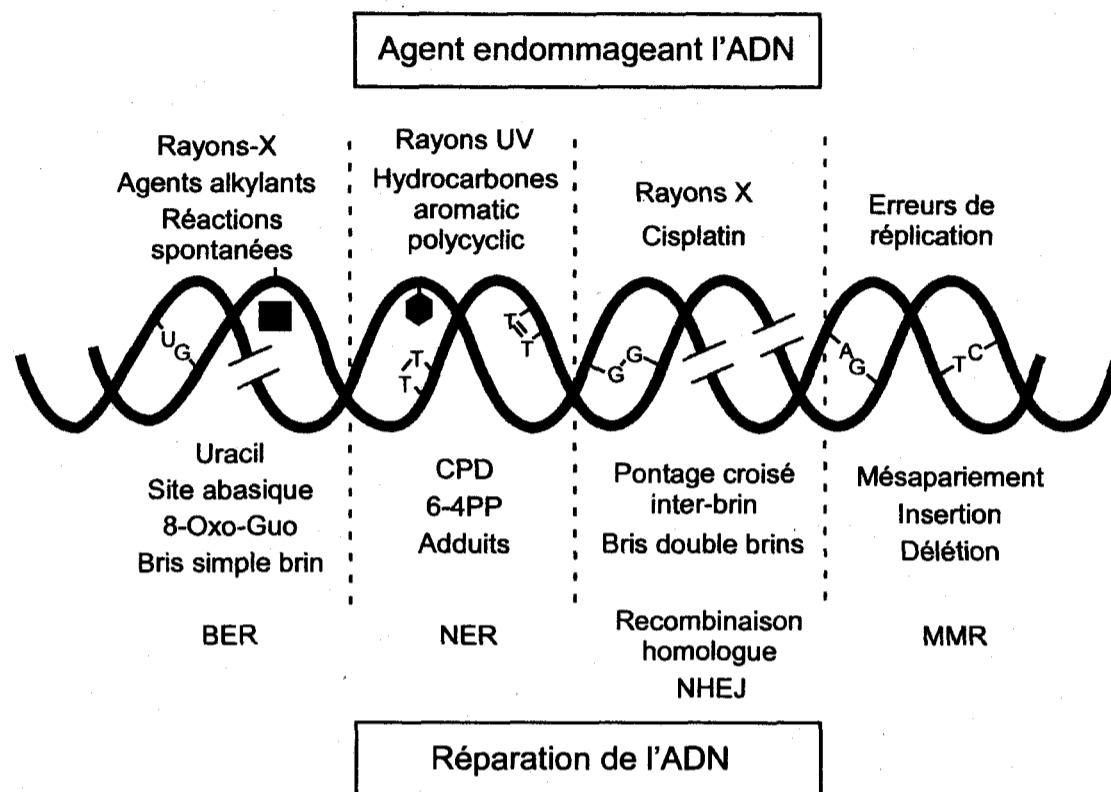


Figure 6 : Résumé des dommages et des systèmes de réparation. L'ADN est soumis à divers agents endommageant l'ADN, de source interne et externe aux cellules (en haut), qui causent différents types de dommages (au milieu). Des mécanismes de réparations sont spécialisés selon les types de dommages (en bas). Inspiré de HOEIJMAKERS, 2001.

1.3.2 - Dommages créés par les rayons ultraviolets

Le soleil émet son énergie sous forme de particules de différentes longueurs d'ondes allant des rayons X aux ondes radios, en passant par les rayons ultraviolets, le spectre du visible et les infrarouges (IR) (figure 7A). Dans l'atmosphère, une forte proportion des rayons hautement énergétiques et dommageables à la vie sont absorbés. Ainsi à la surface de la terre, le rayonnement solaire comprend 55 % d'IR, lesquels renferment l'énergie thermique qui réchauffent la terre, 40 % de lumière visible et 5 % d'UV (figure 3B). Les rayons UV peuvent être subdivisés en trois groupes de longueurs d'ondes différentes. Les UVC allant de 200 nm et 280 nm, les UVB, entre 280 nm et

320 nm, et les UVA, de 320 nm à 400 nm. Tel que discuté, en raison de l'absorption par la couche d'ozone et l'atmosphère, la majorité des rayons UV qui atteignent la surface de la terre sont les rayons UV de plus faible énergie qui appartiennent majoritairement à la gamme des UVA, et faiblement des UVB.

Peu importe la longueur d'onde, tous les types de rayons UV sont très dommageables pour l'ADN et peuvent causer différents types de dommages. Premièrement, les pyrimidines de l'ADN absorbent directement l'énergie des photons dans la gamme

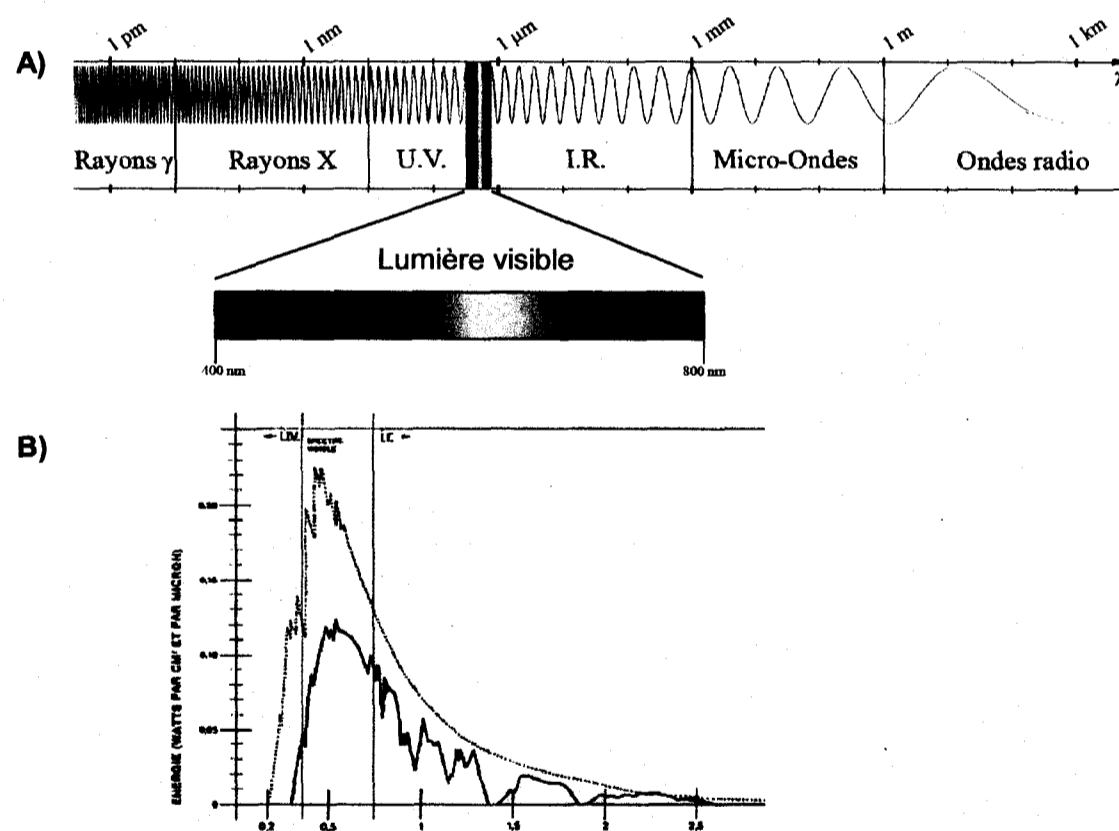


Figure 7 : Émission du soleil. (A) Patron d'émission du soleil. Tiré et adapté de http://fr.wikiversity.org/wiki/Notions_de_base_d'optique_ondulatoire/La_lumiere_une_onda_electromagnetique (B) Graphique de la valeur de l'énergie associée au spectre d'émission du soleil reçue à la limite de l'atmosphère (ligne pointillée), et à la surface de la terre (ligne pleine) en fonction de la longueur d'onde émise. Les lignes pleines verticales délimitent le spectre du visible. Tiré de http://audience.cerma.archi.fr/cerma/pageweb/theorie/solaire/rayont_solaire.html

des UVB et des UVC, provoquant une réaction spontanée indépendante de l'oxygène lorsque deux pyrimidines se suivent dans une chaîne de nucléotides de l'ADN. Deux réactions principales ont été mises en évidence. La plus importante en fréquence est la formation de liaison covalente entre les carbones 5 et 6 de deux pyrimidines adjacentes, menant à la formation d'un cycle à quatre carbones qu'on nomme dimères cyclobutyliques de pyrimidines (Pyr◊Pyr), abrégé par CPD de l'acronyme anglais (CPD : *cyclobutane pyrimidine dimers*) (figure 8A). La flexibilité de la double hélice de l'ADN jouerait en fait un rôle important dans la possibilité de deux pyrimidines adjacentes de former un CPD. En effet, les séquences d'ADN capables de se dérouler et se courber facilement favorisent la formation de CPD (BECKER et WANG, 1989; PEHRSON et COHEN, 1992). À l'inverse, une rigidité dans la molécule d'ADN interfère dans la formation du dommage en empêchant l'alignement optimal entre deux pyrimidines adjacentes, nécessaire pour la réaction. De fait, la courbure induite dans le sillon mineur de l'ADN inhibe la formation de CPD (PEHRSON et COHEN,

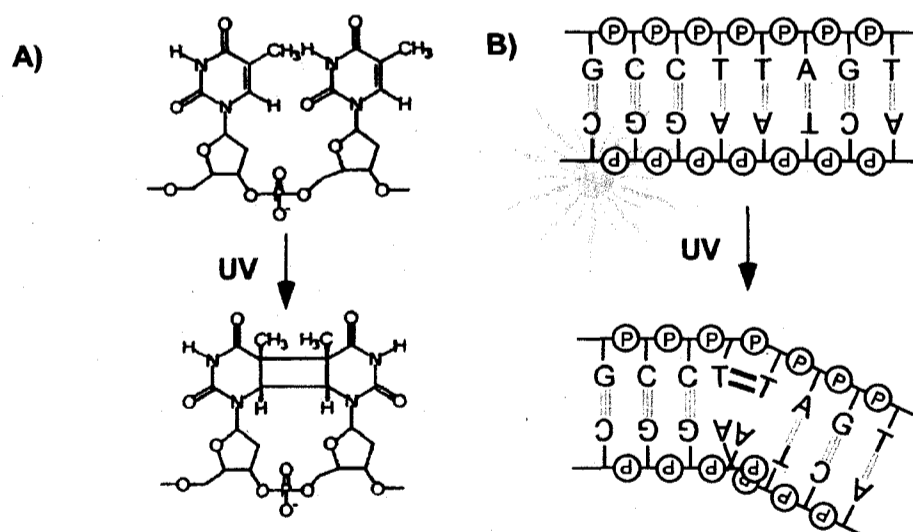


Figure 8 : Formation des CPD dans l'ADN (A) Une liaison covalente cyclique se forme entre deux pyrimidines adjacentes pour créer un CPD. (B) En plus de la modification chimique des bases, les rayons UV modifient aussi la structure tridimensionnelle de la molécule en induisant un angle dans l'ADN.

1992). Ainsi, en plus des modifications chimiques induites dans les bases de l'ADN par la création de nouveaux liens covalents, un CPD cause une modification physique de la molécule en induisant un angle de 7° à 9° dans l'ADN par rapport à l'ADN de forme B (figure 8B) (KIM *et al.*, 1995; WANG et TAYLOR, 1991). La deuxième réaction en fréquence conduit à la formation d'un intermédiaire dioxétanne ou d'une azétidine, qui mène de façon spontanée à la production d'un lien stable entre les carbones 6 et 4 de deux pyrimidines adjacentes pour former ce qu'on appelle un adduit pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4PP) (CADET *et al.*, 2005; RAVANAT *et al.*, 2001). À noter que les adduits 6-4PP sont susceptibles d'être convertis en leurs isomères de valence Dewar par l'absorption de photons UVA (entre 320 et 360 nm), mais l'importance physiologique de ces derniers reste à confirmer (CLINGEN *et al.*, 1995; COURDAVAULT *et al.*, 2005; TAYLOR *et al.*, 1988; TAYLOR *et al.*, 1990). La formation des 6-4(PP) nécessite aussi un déroulement partiel de la double hélice et une torsion des bases dans la molécule pour permettre l'alignement optimal à la dimérisation. Ainsi, la rigidité d'une molécule d'ADN inhibe aussi la formation des 6-4PP (LYAMICHEV *et al.*, 1990; TANG *et al.*, 1991). Par ailleurs, ce type de dommage provoque une modification structurelle de la double hélice encore plus importante que les CPD en induisant un angle de 44° dans la molécule d'ADN (KIM et CHOI, 1995). L'importance de ces deux réactions dépend étroitement de la séquence de l'ADN. En effet, on retrouve les CPD et 6-4PP plus nombreux aux sites thymine-thymine et thymine-cytosine par rapport aux sites cytosine-thymine et cytosine-cytosine (CADET *et al.*, 2005).

À l'inverse des UVB et UVC, les rayons UVA sont peu absorbés par les bases de l'ADN. Néanmoins, des doses d'UVA compatibles avec l'exposition humaine peuvent induire la formation de CPD aux sites TT dans l'ADN par un mécanisme de transfert d'énergie triplet impliquant un photosensibilisateur endogène pour le moment inconnu (CADET *et al.*, 2005; DOUKI *et al.*, 2003; RAVANAT *et al.*, 2001). Bien que les CPD et les 6-4PP représentent la majorité des dommages causés par les UV (CADET *et al.*, 2005; QIN *et al.*, 1996), d'autres types de dommages sont aussi induits par les UVA et les UVB. Parmi ceux-ci, on trouve des mono-adduits dont la photohydratation des cytosines, l'oxydation des guanines en des 8-oxo-7,8-dihydro-2'deoxyguanosine (8-oxo-Guo), la formation d'adduits entre des adénines adjacentes, ou une adénine et une thymine à proximité, des cassures d'ADN simple brin, et le photopontage de protéines avec l'ADN (voir; CADET *et al.*, 1997; KURBANYAN *et al.*, 2003; RAVANAT *et al.*, 2001 pour plus de détails). À des doses d'UVA compatibles avec le rayonnement solaire reçu sur la terre, on retrouve en fait une proportion de 10 :3 :1 :1 de CPD, de purines oxydés (principalement 8-oxo-7,8-dihydroguanine), de pyrimidines oxydés et de cassure d'ADN simple brin, respectivement. Il est d'ailleurs important de mentionner que les CPD induits par les UVA sont considérés comme ayant un pouvoir mutagène majeur par rapport à d'autres types de dommages dont les 8-oxo-Guo (AGAR *et al.*, 2004; KAPPES *et al.*, 2006; KAPPES et RUNGER, 2005; ROCHETTE *et al.*, 2003). Finalement, il est accepté que l'ADN constitue la principale cible cellulaire des effets biologiques des rayonnements ultraviolets, mais il est clair qu'une atteinte chimique de protéines

fonctionnelles par les rayons UV, dont les enzymes et de lipides membranaires, peut aussi affecter la survie cellulaire.

Dans le laboratoire, un rayonnement de 254 nm, correspondant aux UVC, est fréquemment utilisé. Bien que l'utilisation des UVC ne correspond pas à une situation physiologique normale, ce système possède plusieurs avantages. Premièrement, la formation de dommages est plus efficace avec les UVC, alors qu'une longueur d'onde de 260 nm correspond au pic d'absorption des nucléotides de l'ADN. Deuxièmement, les UVC causent principalement des CPD et des 6-4PP (dans une proportion de près de 80 % et 20 %, respectivement), et minimisent les dommages oxydatifs à l'ADN ainsi que les dommages induits aux protéines et aux lipides (CADET *et al.*, 2005; DOUKI *et al.*, 2000). Finalement, le spectre d'émission d'une lampe UVC (au mercure) est beaucoup plus étroit et précis par rapport au spectre d'émission d'autres lampes émettant dans les UVA et UVB. De fait, ces dernières émettent une variété de longueurs d'ondes qui peuvent causer plusieurs types de dommages, une situation plus complexe à contrôler sur le plan expérimental. Ainsi, l'utilisation des UVC permet non seulement de maximiser la quantité de dommages induits dans l'ADN, mais permet surtout de faciliter l'interprétation des résultats qui en découlent, en fonction du type de dommages causés. Par ailleurs, il est important d'insister sur le fait que parmi tous les dommages induits par les UVA et UVB qui atteignent la terre, les CPD représentent les dommages les plus mutagènes pour les cellules (PFEIFER *et al.*, 2005). Ainsi, les UVC en tant que tel ne sont physiologiquement pas représentatifs du rayonnement reçu sur terre, mais les principaux dommages causés par ceux-ci, à

savoir les CPD, représentent très bien les dommages importants causés par le rayonnement qui traverse l'atmosphère.

1.3.3 - Formation des dommages créés par les UV dans un contexte de chromatine

Dans une cellule, les rayons UV frappent l'ADN empaqueté sous forme de chromatine. Différents types de dommages se forment préférentiellement dans l'ADN de liaison ou de façon uniforme entre les régions nucléosomales et internucléosomales (revue dans SMERDON et CONCONI, 1999). Par exemple, les CPD se forment presque en quantité équivalente dans l'ADN nucléosomale et l'ADN de liaison (ADN entre les nucléosomes), alors que les 6-4PP se forment majoritairement dans l'ADN de liaison (MITCHELL *et al.*, 1990; NIGGLI et CERUTTI, 1982; SUQUET *et al.*, 1995). Cependant, on trouve que la distribution des CPD dans l'ADN nucléosomale n'est pas aléatoire (GALE *et al.*, 1987; GALE et SMERDON, 1988; GALE et SMERDON, 1990). En effet, les CPD se forment avec une périodicité moyenne de 10,3 pb, ce qui correspond en fait à la périodicité de rotation de l'ADN autour du nucléosome et qui est similaire à l'empreinte faite par digestion de l'ADN nucléosomale à la DNaseI (NOLL, 1974). En fait, la formation des CPD est favorisée dans les positions de la double hélice d'ADN la plus éloignée de la surface des histones, et le dépliement du nucléosome modifie de façon importante la distribution des CPD, se rapprochant de la distribution que l'on trouve dans l'ADN nu (BROWN *et al.*, 1993). Cependant, il ne s'agirait pas de la présence des histones qui inhiberait la formation des dommages, mais, tel que discuté précédemment, de la courbure induite

par le nucléosome dans l'ADN qui optimise l'angle entre les pyrimidines et favorise la formation des CPD (BROWN *et al.*, 1993; PEHRSON et COHEN, 1992; SMERDON et CONCONI, 1999). Ceci est confirmé, entre autres, par une expérience où l'on trouve une périodicité de formation des CPD d'environ 10 bases, similaire à ce qui est trouvé dans l'ADN nucléosomale, dans un fragment d'ADN nu de 33 pb dans lequel on induit artificiellement par le répresseur λ une courbure mimant celle induite par un nucléosome (PEHRSON et COHEN, 1992).

1.4 - Les mécanismes de réparation de l'ADN

La grande diversité de types de dommages causés dans l'ADN nécessite plusieurs mécanismes de réparation adaptés et efficaces pour chacun d'eux. L'importance de ces mécanismes de réparation se concrétise par le fait qu'ils sont hautement conservés à travers les procaryotes et les eucaryotes. En effet, bien que les protéines de ces mécanismes ne soient pas toujours homologues entre les espèces, les mécanismes en tant que tel procèdent sensiblement de la même façon (HOEIJMAKERS, 2001). La figure 6 vu précédemment présente un résumé des différents mécanismes de réparations importants en fonction des types de dommages.

1.4.1 - Réparation des mésappariements : MMR (mismatch repair)

Les aberrations de complémentarité entre les bases de l'ADN, les boucles d'insertions et de délétions, causées par des ratés de la polymérase à ADN lors de la réplication,

sont réparées par le système de réparation des mésappariements (MMR : *mismatch repair*). Ce mécanisme assure la dégradation de la portion d'ADN nouvellement synthétisé contenant le dommage, offrant ainsi une deuxième chance à la polymérase à ADN de synthétiser un brin intact à partir du brin matrice. La reconnaissance du brin matrice par rapport au nouveau brin se base sur la méthylation du brin matrice, alors que le nouveau brin est transitoirement non méthylé. Ce mécanisme a d'abord été décrit chez la bactérie *E. coli*. Premièrement, la protéine MutS reconnaît le dommage et recrute MutL. MutL interagit ensuite avec MutH qui reconnaît le brin méthylé de l'ADN et induit une coupure dans le brin nouvellement synthétisé et non-méthylé. L'hélicase UvrD déroule les brins jusqu'au dommage et des exonucléase dégradent ce dernier. La polymérase à ADN remplit la portion d'ADN simple brin, et la ligase complète la réparation (JIRICNY, 2006). Chez l'humain, la situation apparaît plus complexe. Plusieurs protéines sont nécessaires pour ce mécanisme de réparation, sous le modèle des protéines prototype MutS et MutL de la bactérie. Ainsi, l'hétérodimère MSH2/6 s'occupe de la reconnaissance des mésappariements, alors que MSH2/3 reconnaît les boucles d'insertions et de délétions. Le dimère MLH1/PMS2 s'occupe du clivage du brin endommagé, de sorte que la suite de la réparation s'effectue sensiblement tel que décrit pour la bactérie (JIRICNY, 2006). L'absence ou la déficience de ce mécanisme chez l'humain limite la réparation de ce type de dommage, pouvant mener ultimement à l'apparition du cancer (JIRICNY, 2006).

1.4.2 - Réparation par excision des bases : BER (base excision repair)

La réparation par excision des bases (BER : *base excision repair*) est responsable de la correction des dommages induits sur une seule base. De fait, ce mécanisme permet la réparation des dommages causés à la suite d'une oxydation, d'une alkylation ou d'une déamination des bases de l'ADN. Dans ce processus, une glycosylase à ADN élimine la base endommagée pour créer un site abasique. Une hydrolyse spontanée d'un nucléotide, une dépurination ou une dépyrimidination, peut aussi créer un site abasique, lequel est traité par la BER. Peu importe son origine, le site abasique est traité par une endonucléase (APE1) qui clive le désoxyribose induisant un bris simple brin dans le squelette phosphate de l'ADN. Il est à noter qu'un bris simple brin causé directement par des radiations ou un agent chimique peut aussi être pris en charge par la réparation par excision de nucléotide. La BER se sous divise ensuite en deux mécanismes, soit un mécanisme principal qualifié de courte réparation (*short-patch*) et une voie secondaire de longue réparation (*long-patch*). La courte réparation assure le remplissage du nucléotide manquant par une polymérase à ADN, suivi d'une ligation, alors que la longue réparation synthétise de l'ADN par une polymérase à ADN à partir du brin matrice sur 2 à 10 nucléotides, déplaçant la molécule déjà hybridé. Dans ce cas, la réparation est complétée par la ligation et le clivage du fragment déplacé (HOEIJMAKERS, 2001). Plusieurs glycosylases à ADN existent et correspondent spécifiquement à l'élimination d'un type de base endommagée. Par exemple, l'uracile-ADN-glycosylase permet la réparation des dommages présents sur les bases d'uracile (ROBERTSON *et al.*, 2009).

1.4.3 - Réparation des cassures d'ADN double brins : la recombinaison homologue et la NHEJ (non-homologous end-joining)

Les cassures d'ADN double brins représentent un défi de taille pour une cellule. En effet, pour réparer ce type de dommage, la cellule doit retrouver parmi le génome complet, quelles extrémités doivent être rattachées l'une à l'autre, sans quoi l'intégrité du génome et par conséquent la survie de la cellule sont en jeu. Pour ce faire, deux mécanismes différents existent : la jonction des extrémités non-homologues (NHEJ : *non-homologous end joining*), et la recombinaison homologue (SAN FILIPPO *et al.*, 2008). La NHEJ prédomine en phase G1 du cycle cellulaire, là où une seule copie du génome est présente. Ce mécanisme permet la liaison des deux molécules d'ADN et procède de la façon suivante. L'hétérodimère KU s'attacherait aux extrémités d'ADN et faciliterait leur rapprochement. Par la suite, une protéine kinase ainsi qu'une ligase complèteraient la réparation (LIEBER, 2008). Ce mécanisme de réparation est parfois associé à la perte ou au gain de quelques nucléotides, ce qui en fait un mécanisme peu fidèle quant à la conservation de la séquence (POPLAWSKI et BLASIAK, 2005).

À l'inverse, la recombinaison homologue constitue un mécanisme de réparation hautement fidèle qui prédomine pendant la phase S et la phase G2 du cycle cellulaire, périodes durant lesquelles une deuxième copie de chromosome intact issue de la réplication de l'ADN (la chromatide sœur) est présente. Chez la levure *S. cerevisiae*, la recombinaison homologue est assurée par les gènes membres du groupe épistatique de *RAD52*, incluant le complexe MRX (formé par les gènes *MRE11*, *XRS2* et

RAD50), et les gènes *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59* et *RDH54/TID1* (KROGH et SYMINGTON, 2004). Ce mécanisme de réparation procède à travers une série d'étapes qui s'amorce par la dégradation de 5' vers 3' des deux extrémités de la cassure, où le complexe MRX agirait comme régulateur (revu dans KROGH et SYMINGTON, 2004). L'extrémité d'ADN simple brin issue de cette dégradation est liée par Rad51p pour former un filament nucléoprotéique capable de faire la recherche et l'invasion du brin homologue dans le génome, suivi de la migration des branches. La formation du filament de Rad51p est assistée par les

protéines Rad52p, Rad55p et Rad57p. Par la suite, la réplication de l'ADN synthétise une copie intacte de la molécule d'ADN en utilisant le brin homologue comme matrice, ce qui mène à la formation d'une jonction de Holliday, laquelle est résolue par l'hétérodimère Mus81p-Mms4p (figure 9) (revue dans KROGH et SYMINGTON, 2004). La perte de quelconque gènes du groupe épistatique de *RAD52* entraîne une hypersensibilité des cellules aux agents causant des cassures d'ADN double brins tels les radiations γ et les agents chimiques radio-mimétiques (revue dans KROGH et SYMINGTON, 2004).

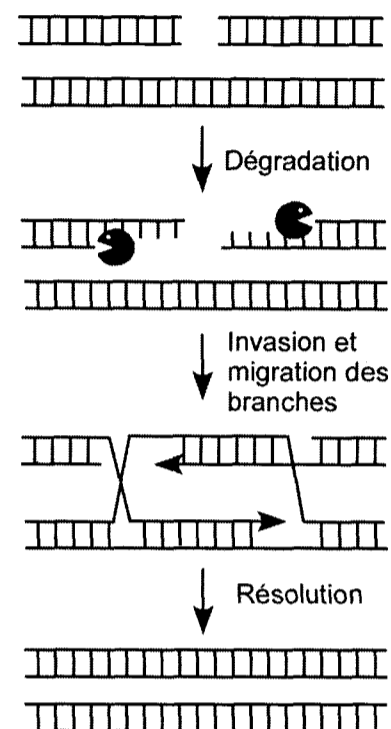


Figure 9 : Mécanisme de la recombinaison homologue.
Voir le texte pour les détails.

1.4.4 – La photoréversion des dommages créés par les UV.

La photoréactivation constitue un mécanisme très rapide et efficace qui utilise l'énergie de la lumière blanche pour effectuer la réparation des CPD et des 6-4PP causés par les rayons UV. Ce mécanisme de réparation est catalysé par la photolyase, une enzyme monomérique, qui ramène les dimères de nucléotides vers leur forme originale. Le mécanisme de photoréactivation est en fait bien connu. Dans le cas des CPD, la photolyase se lie à l'ADN contenant le dommage et déplace le CPD en question dans le site actif de l'enzyme. Par la suite, la réversion du dommage en deux pyrimidines distinctes est catalysée par la lumière (350-450 nm) (KAO *et al.*, 2005; MEES *et al.*, 2004), de sorte que l'enzyme peut se détacher de l'ADN (WEBER, 2005). La photolyase est présente dans plusieurs espèces à travers les trois règnes, dont la bactérie *E. coli* et la levure *S. cerevisiae*, mais absente dans les cellules humaines (consulter SANCAR, 2003 pour une revue sur le sujet). Pour éviter une réparation des dommages par la photolyase, il suffit de travailler dans des cellules où l'enzyme est inactive, soit à la suite de sa modification génétique, ou en travaillant en absence de lumière activatrice.

1.4.5 - Réparation par excision de nucléotides : NER (nucleotide excision repair)

La réparation par excision de nucléotides (NER) est un mécanisme spécialisé dans la réparation de dommages qui déforment la double hélice d'ADN, tel que les adduits encombrants et les pontages intra-brins. La NER est aussi impliquée dans la

réparation des pontages inter-brins, lesquels sont reconnus comme étant hautement toxiques. Ceci en fait un mécanisme de réparation avec une spécificité de substrat très large. La versatilité et l'importance de la NER se reflète, entre autres, par le nombre et la diversité de maladies génétiques chez l'humain qui découlent de mutations dans des gènes impliqués dans ce mécanisme, causant entre autres un risque élevé de développer des cancers ou un vieillissement prématuré (ANDRESSOO *et al.*, 2005; HOEIJMAKERS, 2001; HOEIJMAKERS, 2009). La NER peut être subdivisée en deux sous-mécanismes, la réparation globale du génome (GG-NER : *global genomic nucleotide excision repair*), et la réparation couplée à la transcription (TC-NER : *transcription coupled nucleotide excision repair*) (figure 10). Seul le mécanisme de reconnaissance du dommage diffère entre ces deux mécanismes. La GG-NER permet

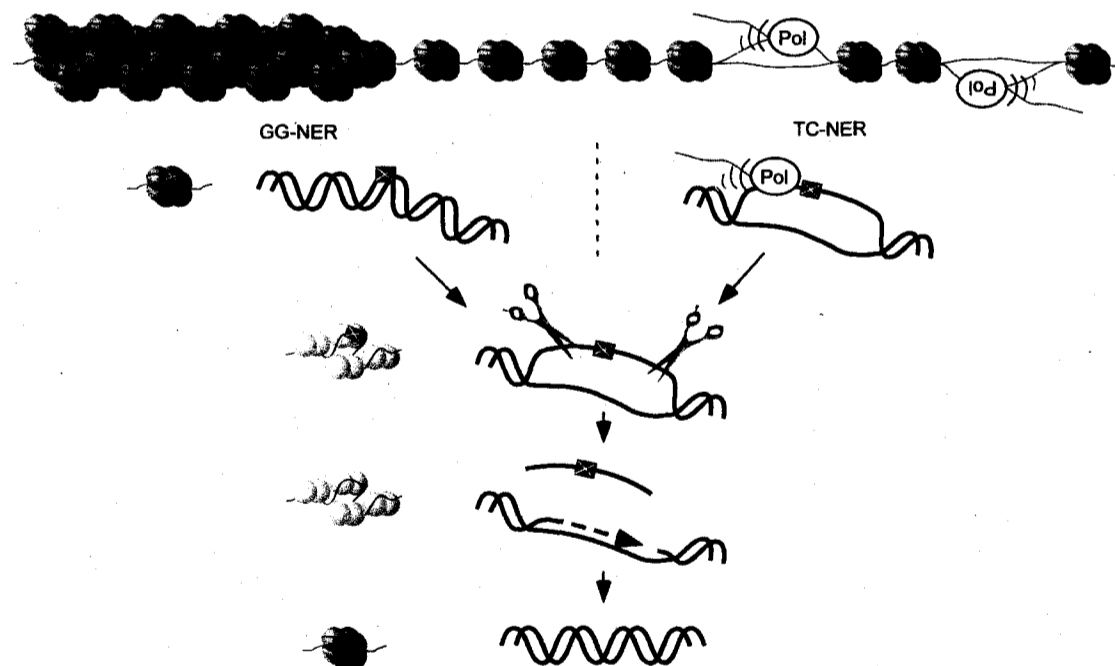


Figure 10 : La réparation par excision de nucléotide se subdivise en deux mécanismes: la réparation globale du génome (GG-NER) et la réparation couplée à la transcription (TC-NER). Seule l'étape de la reconnaissance du dommage diffère entre ces deux mécanismes, alors que la suite de la NER procède de la même façon. Après l'étape de reconnaissance, il y a incision de chaque côté du dommage, excision d'un oligonucléotide contenant le dommage, ce qui laisse place à une polymérase à ADN pour synthétiser une molécule d'ADN intacte. La ligation complète la réparation. La NER doit procéder dans un contexte de chromatine. Pour se faire, la chromatine doit être réarrangée pour permettre l'accès de la machinerie de réparation. Une fois la réparation complétée, la chromatine doit reprendre son état original.

la reconnaissance et la réparation des dommages présents partout dans le génome. Pour sa part, la TC-NER constitue un mécanisme de réparation plus rapide et efficace que la GG-NER. La TC-NER procède en fait à la reconnaissance des dommages présents sur le brin transcrit des gènes actifs grâce à la polymérase à ARN qui bloque physiquement aux nucléotides endommagés. Il a été longtemps considéré que la réparation couplée à la transcription survenait exclusivement dans les gènes transcrits par l'ARN polymérase II. Cependant, la TC-NER a récemment été décrite dans les gènes transcrits par l'ARN polymérase I, du moins chez la levure *S. cerevisiae* (CONCONI *et al.*, 2002; CONCONI *et al.*, 2005; MEIER *et al.*, 2002; VERHAGE *et al.*, 1996). Au-delà de la reconnaissance du dommage, toutes les étapes subséquentes de la NER sont les mêmes et utilisent un assemblage protéique commun (figure 10). Ainsi, après reconnaissance du dommage, l'ADN est déroulé de façon à permettre une incision en 5' et 3' du dommage, ce qui permet l'excision d'un oligonucléotide de 24 à 32 nucléotides. Par la suite, la machinerie de réplication assure la synthèse d'ADN à partir de la copie intacte de l'ADN. Finalement, une ligase à ADN vient attacher les deux nucléotides voisins entre eux pour compléter la réparation (consulter HOEIJMAKERS, 2001; HOEIJMAKERS, 2009; PRAKASH et PRAKASH, 2000 pour des revues complètes sur le sujet).

La NER chez la bactérie *Escherichia Coli* constitue l'un des premiers mécanismes de réparation découverts (BOYCE et HOWARD-FLANDERS, 1964; SETLOW et CARRIER, 1964). Dans cet organisme, la NER est réalisée par le produit des gènes *uvrA*, *uvrB* et *uvrC*, qui assurent la reconnaissance et le clivage de l'ADN endommagé

dans une suite de réactions dépendantes de l'ATP (HILL, 1958; HOWARD-FLANDERS et THERIOT, 1962; VAN DE PUTTE *et al.*, 1965). Premièrement, un complexe formé de deux UvrA et un UvrB (UvrA₂B) scrute le génome et s'attache aux dommages. UvrA quitte ensuite le complexe pour laisser place à UvrB, qui ouvre la molécule d'ADN et recrute UvrC. Ce dernier crée des coupures d'ADN simple brin de chaque côté du dommage pour exciser avec l'aide d'UvrD (ayant une activité hélicase) un oligonucléotide. Finalement, la réparation est complétée par une polymérase à ADN suivie d'une ligase qui rattache les nucléotides voisins. Chez *E.coli*, la réparation accélérée du brin transcrit (TC-NER) s'initie par une polymérase à ARN qui bloque sur un dommage. Par la suite, la protéine Mfd se lie à la lésion, détache l'ARN polymérase, et recruterait le complexe UvrA₂B pour permettre la NER tel que décrit ci-haut (consulter MELLON, 2005; THEIS *et al.*, 2000 pour plus de détails).

Chez la levure *S. cerevisiae*, la NER procède par les mêmes étapes. Dans cet organisme, les gènes impliqués ont été classés en deux catégories en fonction de la sensibilité aux rayons UV des mutants de délétions. Ainsi, les gènes de classe I (*RAD1*, *RAD2*, *RAD3*, *RAD4*, *RAD10*, *RAD14* et *RAD25*) sont impliqués au cœur de la NER, et les mutants de délétions démontrent une sensibilité importante aux rayons UV. À l'inverse, les gènes de classe II (*RAD7*, *RAD16*, *RAD23* et *MMS19*) jouent un rôle plus marginal dans le mécanisme, de sorte que les mutants montrent une sensibilité moyenne (PRAKASH et PRAKASH, 2000). Voici les étapes importantes de la NER chez la levure *S. cerevisiae*. Premièrement, la protéine Rad14p serait

responsable de la reconnaissance des CPD, qui permettrait l'assemblage d'un complexe protéique comprenant Rad23p, Rad4p et TFIIH (qui comprend deux hélicases à ADN; Rad3p et Rad25p). Par la suite, l'hétérodimère Rad1p-Rad10p clive le brin de l'ADN en 5' du dommage, alors que la protéine Rad2p crée l'incision en 3'. Ceci permet l'excision d'un oligonucléotide contenant le dommage, suivi de la polymérisation d'une nouvelle molécule d'ADN intacte en utilisant le brin non endommagé comme matrice. La ligation des nucléotides voisins vient compléter la réparation (consulter PRAKASH et PRAKASH, 2000 pour plus de détails). Par ailleurs, les produits des gènes *RAD26* et *RAD34* sont impliqués dans la TC-NER initiée par la polymérase à ARN II et I, respectivement (DEN DULK *et al.*, 2005;

Tableau 1 - Comparaison des gènes impliqués dans la NER chez la levure *S. cerevisiae* vs chez l'humain.

<i>S. cerevisiae</i>	Fonction	<i>Human</i>	Fonction
Rad1\10p	Endonuclease simple brin, clive en 5'du dommage.	XPF-ERCC1	Endonuclease simple brin, clive en 5'du dommage.
Rad2p	Endonuclease simple brin, clive en 3'du dommage.	XPG	Endonuclease simple brin, clive en 3'du dommage.
Rad3p	Sous-unité de TFIIH, hélicase 5'-3'	XPD	Sous-unité de TFIIH, hélicase 5'-3'
Rad4p	Protéine de liaison du dommage	XPC	Protéine de liaison du dommage, rôle suggéré dans le positionnement de TFIIH
Rad14p	Protéine de liaison du dommage	XPA	Protéine de liaison du dommage
Rad7\16p-Abf1	Liaison au dommage dépendant de l'ATP; impliqué dans la GG-NER.		
		DDB1	ligase DDB1-CUL4A-based
		DDB2	Participe à l'ubiquitylation de l'histones H3 et H4, pour faciliter la réponse cellulaire au dommage à l'ADN
Rad23p	Lie/régule Rad4p	HR23B	Se lie à XPC
Rad26p	Activité ATPase dépendant de l'ADN; impliqué dans la TC-NER dépendant de la polymérase à ARN II	CSB	Activité ATPase dépendant de l'ADN; impliqué dans la TC-NER dépendant de la polymérase à ARN II
Rad28p	Inconnu	CSA	Se lie à DDB1, impliqué dans la TC-NER dépendant de la polymérase à ARN II
Rad33p	Lie Rad4p		
		Centrin2	Lie XPC et stimule la NER
Rad34p	Binds Rad23p, belongs to Rad4p/XPC family		
Tfb1p	Sous-unité TFIIH	p62	Sous-unité TFIIH
Tfb2p	Sous-unité TFIIH	p52	Sous-unité TFIIH
Tfb4p	Sous-unité TFIIH, interagit avec Ssl1p	p34	Sous-unité TFIIH
Ssl1p	Sous-unité TFIIH, interagit avec Tfb4p	p44	Sous-unité TFIIH
Ssl2p (RAD25)	Sous-unité TFIIH, hélicase 3'-5'	XPB	Sous-unité TFIIH, hélicase 3'-5'
Met18p (MMS19)	Régule l'activité de TFIIH	hMMS19	Interagit avec XPD et XPB
RPA (Rfa1/2/3p)	Liaison de l'ANDsb	RPA	Liaison de l'ANDsb

Tire et adapté de TREMBLAY *et al.*, 2009

TREMBLAY *et al.*, 2008; VAN GOOL *et al.*, 1994), alors que la réparation du brin non-transcrit est assurée par la GG-NER, qui nécessite le complexe protéique Rad7p-Rad16p et Abf1p (YU *et al.*, 2004).

Le complexe protéique de la NER est en fait hautement conservé entre la levure *S. cerevisiae* et l'humain (tableau 1). De fait, les études réalisées chez la levure ont permis, et permettent toujours, une contribution importante dans la compréhension du mécanisme de la NER chez l'humain (consulter PRAKASH et PRAKASH, 2000 pour une revue complète). La force de la levure réside dans sa puissance comme outil génétique et biochimique, permettant la réalisation d'expériences qui seraient difficiles à réaliser avec des cellules de mammifères.

1.4.6 - Entrecroisement des mécanismes de réparation

Chacun de ces mécanismes est spécialisé pour réparer un type de dommage bien précis. Cependant, il est maintenant clair qu'il n'existe pas de séparation stricte entre les différents mécanismes de réparation de l'ADN, et que les facteurs impliqués dans la réparation d'un type de dommage peuvent être impliqués dans la réparation d'une autre variété de dommages. Par exemple, l'hétérodimère Rad1p/Rad10p essentiel à la NER chez la levure *S. cerevisiae*, est aussi impliqué dans la recombinaison homologue (GUZDER *et al.*, 2006; IVANOV et HABER, 1995). Par ailleurs, une récente revue de littérature discute de l'implication des protéines de la NER et de la réparation des mésappariements (MMR) dans le mécanisme de réparation des

cassures d'ADN double brins (ZHANG *et al.*, 2009). D'autres exemples démontrent que la protéine de recombinaison homologue RAD52 coopère avec la protéine OGG1 impliquée dans la réparation par excision pour la réparation des dommages oxydatifs chez les cellules de mammifères (DE SOUZA-PINTO *et al.*, 2009), et que la réparation des pontages protéine-ADN nécessite la coordination de la réparation par recombinaison homologue et la réparation par excision de nucléotide chez plusieurs organismes (IDE *et al.*, 2008; NAKANO *et al.*, 2007).

Il est clairement accepté dans la communauté scientifique que la réparation des dommages créés par les UV procède en principe par la NER. Néanmoins, quelques études démontrent un lien entre la recombinaison homologue et les dommages créés par les rayons UV. Par exemple, la délétion du gène *RAD52* rend les cellules de levure plus sensibles aux rayons UV (GANGAVARAPU *et al.*, 2007; SANTA MARIA *et al.*, 2007), et les CPD présents sur le brin transcrit des gènes actifs pourraient être réparés par un mécanisme impliquant recombinaison homologue, en interaction avec la NER (ABOUSSEKHRA et AL-SHARIF, 2005). De plus, il est connu que l'irradiation de cellules aux rayons UV induit la recombinaison homologue, potentiellement une conséquence de la NER en elle-même, et des fourches de réplication bloquées aux CPD qui mènent à des cassures d'ADN simple brin (FABRE et ROMAN, 1977; GALLI et SCHIESTL, 1995; GROMPONE *et al.*, 2004; KUZMINOV, 1999; LETTIER *et al.*, 2006; MORIMATSU et KOWALCZYKOWSKI, 2003; NAKAI et MORTIMER, 1969; PRAKASH *et al.*, 1980; SIMON et MOORE, 1988; TSENG *et al.*, 1994). Cependant, il n'apparaît

présentement pas clair quelle est l'interaction et l'importance relative de la recombinaison homologue par rapport à la NER, pour la réparation des dommages créés par les UV, et par conséquent pour la survie des cellules irradiées.

1.4.7 - Mécanisme de réparation de l'ADN dans un contexte de chromatine

Tous les mécanismes de réparation de l'ADN doivent procéder dans un contexte de chromatine, où les dommages sont plus difficilement accessibles pour une machinerie protéique complexe. Ainsi, les modifications chimiques apportées aux nucléosomes, dont l'acétylation des queues des histones, de même que le remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP, sont deux mécanismes nécessaires pour permettre une ouverture de la chromatine menant à une réparation efficace des dommages présents dans l'ADN (consulté HUERTAS *et al.*, 2009 pour plus de détails). L'intérêt du laboratoire se porte principalement sur la réparation des dommages créés par les rayons UV. Par conséquent, nous allons maintenant discuter des impacts connus de la chromatine sur la NER.

1.4.7.1 – Réparation des CPD dans la chromatine

La NER constitue un assemblage multiprotéique complexe qui permet de reconnaître, retirer et remplacer un dommage induit par les UV dans l'ADN (figure 10). L'avancement des connaissances sur le fonctionnement de la NER dans un contexte de chromatine est primordial pour la compréhension des processus provoquant

l'apparition de mutations menant ultimement au cancer chez l'humain, de même que pour l'élaboration de stratégies permettant de contrer son développement.

Les premiers pas dans l'analyse de la réparation des CPD dans un contexte de chromatine ont été effectués à partir de système *in vitro* (consulter SMERDON et CONCONI, 1999; TREMBLAY *et al.*, 2009 pour plus de détails). Par exemple, il a été démontré que des extraits de cellules humaines ne peuvent réparer efficacement de l'ADN reconstitué sous forme de nucléosome après une irradiation aux rayons UV (WANG *et al.*, 1991), et que la réparation de l'ADN avec ces extraits est plus efficace sur de l'ADN nu par rapport à des minichromosomes SV40 (SUGASAWA *et al.*, 1993). Ceci s'est d'ailleurs avéré tout aussi vrai en utilisant des facteurs purifiés de la NER (ARAKI *et al.*, 2000). Par ailleurs, des études semblables ont été réalisées avec un nucléosome reconstitué sur de courtes séquences d'ADN contenant des dommages, et des extraits nucléaires d'oocytes de *Xenopus borealis*. Ces expériences ont aussi montrés que la présence de nucléosomes inhibe fortement la réparation des CPD (KOSMOSKI *et al.*, 2001; LIU et SMERDON, 2000). De la même façon, il a été montré que l'affinité de XPA, RPA et XPC, impliqués dans la reconnaissance des dommages, est diminuée lors de l'analyse de la réparation d'un 6-4PP présent sur une séquence d'ADN assemblée sur un nucléosome, et ce, que ce soit en utilisant un extrait cellulaire ou des facteurs de réparation humains reconstitués. Conséquemment, la réparation est beaucoup plus lente dans l'ADN nucléosomale par rapport à l'ADN nu (HARA *et al.*, 2000). Ces études montrent que l'unité fondamentale de la chromatine que constitue le nucléosome inhibe la réparation des CPD par la NER, du

moins *in vitro*. Cette conclusion se confirme lors de l'analyse de la réparation des dommages *in vivo*. En effet, des études chez la levure *S. cerevisiae* ont démontrées que la présence de nucléosome complet ralentit la réparation des CPD. De plus, il est connu que la réparation de CPD et de 6-4PP présents sur le brin transcrit d'un gène actif est rapide et uniforme, alors que la réparation sur le brin non-transcrit est généralement plus lente, et modulée par la position des nucléosomes (FERREIRO *et al.*, 2004; TENG *et al.*, 2005; TIJSTERMAN *et al.*, 1999; WELLINGER et THOMA, 1997).

Ainsi, la NER nécessiterait un réarrangement des nucléosomes pour assurer une accessibilité à l'ADN permettant une réparation efficace (figure 10) (consulter GONG *et al.*, 2005; REED, 2005; TENG *et al.*, 2005; THOMA, 2005 pour plus de détails). De fait, il existe des évidences que des modifications covalentes des histones ont lieu pendant la NER (RAMANATHAN et SMERDON, 1989; TENG *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2005), et que le remodelage de la chromatine facilite ce mécanisme de réparation (CITTERIO *et al.*, 2000; FRIT *et al.*, 2002; GONG *et al.*, 2006; GREEN et ALMOUZNI, 2002; HARA et SANCAR, 2002; HARA et SANCAR, 2003; NAG *et al.*, 2008; URA *et al.*, 2001; URA et HAYES, 2002; YU *et al.*, 2005). De plus, le facteur d'assemblage de la chromatine (CAF1), qui joue un rôle central chez *S. cerevisiae* dans l'assemblage de la chromatine après la réplication (SMITH et STILLMAN, 1989; VERREAULT, 2000), serait aussi impliqué pour reformer la structure originale de la chromatine après la réparation (GAILLARD *et al.*, 1996; GAILLARD *et al.*, 1997; GREEN et ALMOUZNI, 2003; MELLO et ALMOUZNI,

2001; MELLO *et al.*, 2002; MOGGS *et al.*, 2000). Tous ces résultats ont permis de préciser un modèle de réparation dans un contexte de chromatine en trois étapes, soit la reconnaissance d'un dommage, la réparation, rendue possible par l'accessibilité au dommage par déploiement ou glissement du nucléosome, suivie du repositionnement du nucléosome tel qu'il était avant la réparation (figure 10) (voir GREEN et ALMOUZNI, 2002; TREMBLAY *et al.*, 2009 pour une revue). Cependant, il est important de mentionner que l'hyperacétylation de l'histone H3 dans le promoteur du gène *MFA2* chez *S. cerevisiae*, ainsi que le remodelage de la chromatine surviennent rapidement en quelques minutes à la suite de l'irradiation, et ce, malgré l'absence de la NER (YU *et al.*, 2005). De plus, la présence d'un dommage créé par les UV induit l'assemblage de la chromatine dans les gènes actifs du locus d'ADN ribosomal, encore une fois malgré l'absence de la NER (CONCONI *et al.*, 2005). Ainsi, ces résultats suggèrent que certaines modifications de la chromatine peuvent survenir indépendamment de la réparation. Par conséquent, le rôle de la modification de la chromatine dans le processus de réparation des CPD n'apparaît pas parfaitement clair. Dans les faits, la mobilité naturelle du nucléosome sur une séquence d'ADN pourrait laisser suffisamment d'espace pour permettre une réparation efficace du dommage (THOMA, 2005).

1.4.7.2 – Réparation des CPD dans l'hétérochromatine

Tel que discuté précédemment, il existe chez les cellules eucaryotes deux formes de chromatine; une forme ouverte et une forme fortement condensée appelée

hétérochromatine. Comment procède la réparation des dommages créés par les UV dans les régions hétérochromatiques demeure un sujet peu exploré (SMERDON et CONCONI, 1999). Chez la levure *S. cerevisiae*, il a été démontré que la réparation des CPD est inhibée dans le gène *URA3* inséré artificiellement à 2 kb d'un télomère, lorsque ce dernier est totalement réprimé (LIVINGSTONE-ZATCHEJ *et al.*, 2003). De plus, la NER est aussi inhibée au locus *HML* par des mutations de l'histone H3 qui augmente le recrutement des protéines Sir au locus, ce qui aurait comme conséquence de réduire l'accessibilité de la machinerie de réparation à l'ADN (CHAUDHURI *et al.*, 2009). Globalement, on peut tirer comme conclusion de ces expériences qu'une augmentation de la répression inhibe la NER. Cependant, peu d'expériences rapportent l'impact de l'hétérochromatine normale formée par les protéines Sir sur la réparation de l'ADN. À ce titre, il a été démontré que le locus *HML* est réparé plus lentement que le locus *MAT* dans des cellules de type sauvage, et que cette différence est abolie dans un mutant *sir3Δ* (TERLETH *et al.*, 1990; TERLETH *et al.*, 1989). Cependant, il est impossible avec ces expériences de discriminer s'il s'agit de la transcription présente au locus *MAT* qui permet une réparation plus rapide, où si la machinerie de réparation possède un meilleur accès à l'ADN dans une structure de chromatine permissive par rapport à une structure hétérochromatique. Une analyse plus approfondie de la réparation du locus du type sexuel dans différents mutants et différentes conditions permettrait d'ajouter à la compréhension du rôle de la transcription par rapport à la structure de la chromatine, qui influencerait la réparation des CPD.

1.5. - Hypothèses et questions de recherche.

Un des intérêts principal du laboratoire Conconi est de comprendre comment fonctionne la réparation des CPD dans différentes formes de chromatine. Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi de scinder cette question globale en deux volets : 1- existent-ils des gènes qui sont impliqués dans la modification de la chromatine qui viendraient aider ou nuire à la réparation *in vivo* des dommages créés par les UV; et 2- quel est l'impact de l'hétérochromatine sur la réparation des CPD? De façon intéressante, l'évolution du projet a fait en sorte que l'étude du volet 2 est devenue une suite logique découlant du volet 1. En effet, dans la recherche de facteurs impliqués dans la modification de la chromatine qui affecteraient la survie des cellules, nous avons identifié une famille de gènes (les gènes *SIR*), qui sont impliqués dans la formation de l'hétérochromatine. Après avoir caractérisé le phénotype de survie cellulaire de ces mutants irradiés aux rayons UV, nous avons procédé à l'analyse moléculaire de la cinétique de réparation des CPD aux régions hétérochromatiques, entre les cellules de type sauvage et les mutants *sirΔ*, dans lesquels l'hétérochromatine est absente.

1.5.1 – Choix du modèle d'étude.

Nous utilisons comme modèle d'étude la levure de cuisson *Saccharomyces cerevisiae*. Celle-ci présente plusieurs avantages indéniables par rapport à un système de cellules de mammifères, notamment la rapidité de division cellulaire qui facilite

l'expérimentation, et la facilité d'obtenir un mutant de délétion dans lequel un gène précis est complètement retiré. De fait, nous profitons dans le laboratoire d'une collection de souches qui contient tous les mutants de délétions viables de la levure *S. cerevisiae* (WINZELER *et al.*, 1999). Ainsi, non seulement il est facile de créer à l'aide des techniques de génie génétiques ces mutants, mais ceux-ci sont directement disponibles. De plus, tel que mentionné précédemment, les gènes de la levure impliqués dans la NER ont pour la plupart un homologue fonctionnel chez l'humain (tableau 1). À noter que les gènes de la NER dont les mutations chez l'humain sont reliées à des maladies tels le syndrome de Cockayne et le Xeroderma pigmentosum, possèdent un homologue chez la levure *S. cerevisiae* (ANDRESSOO *et al.*, 2005; HOEIJMAKERS, 2009).

2 - A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures

2.1 – Avant-propos de l'article 1

Cet article, dont Geneviève Levasseur, Julien Gervais-Bird, Raymund Wellinger, Sherif Abou Elela et Antonio Conconi font partis des auteurs, présente l'argumentaire démontrant la nécessité de développer une méthode plus sensible que l'approche classique de dénombrement de colonies sur milieu solide, pour tester le phénotype de souches mutantes qui montreraient un taux de croissance, ou un temps de latence affectés par un traitement donné, sans toutefois toucher le nombre de cellules qui survivent directement. Pour répondre à ce besoin, j'ai personnellement mis au point les conditions et validé une méthode de suivi de la croissance par absorbance des cellules en milieu de culture liquide, à l'aide d'un lecteur de plaque multi-puits. Cette approche a permis une semi-automatisation de la méthode en obtenant une lecture d'absorbance tous les dix minutes, et ce, pendant le temps voulu. Associé à cette semi-automatisation, Julien Gervais-Bird a développé un algorithme informatique permettant l'analyse des données produites par le lecteur de plaque, afin de fournir les paramètres de croissance pour les 96 puits d'une plaque. J'ai interagit directement avec Julien dans le développement conceptuel de l'algorithme, afin de s'assurer que le script en question fournisse des paramètres pertinents selon les besoins biologiques de nos analyses. J'ai procédé à la validation de la méthode en utilisant trois agents endommageant l'ADN qui ciblent différents mécanismes de réparation, soit le méthyl-méthane sulfonate, la bléomycine, et les rayons UV. Par la

suite, sous ma supervision initiale, Geneviève Levasseur a procédé au criblage ciblé des mutants de gènes d'histones acétyl transférase et d'histones déacétylases, ce qui nous a mené à identifier quatre mutants ayant une récupération différente par rapport aux cellules de type sauvage, dont le mutant *sir2Δ* montrant une résistance aux rayons UV, pour lequel nous avons porté un plus grand intérêt.

La publication de cet article dans *Mutation research; environmental mutagenesis and toxicology*, a suscité un important intérêt dans la communauté scientifique. En effet, plusieurs demandes de partage du script permettant l'analyse des courbes de croissances nous ont été faites, demandes auxquelles nous avons répondu dans les plus brefs délais. De plus, la revue **Nature Protocols** nous a contacté personnellement afin de reprendre l'article sous une forme épurée présentant le protocole détaillé. L'article TOUSSAINT et CONCONI (2006), est disponible gratuitement sur le web, et une copie de l'article est en annexe de la thèse.

2.2 – Résumé de l'article

La plupart des méthodes populaires pour détecter la sensibilité de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à des agents endommageant l'ADN sont basées sur le dénombrement de colonies sur milieu solide. Cette méthode s'avère cependant peu sensible pour tester des mutants de délétion de gènes qui seraient impliqués indirectement dans un mécanisme de réparation, ce qui affecterait soit le taux de croissance des cellules traitées, ou le temps nécessaire à la récupération de la croissance des cellules, sans toutefois changer le nombre de cellules qui survivent au traitement. Ce phénotype serait difficilement détectable par dénombrement de colonies sur milieu solide, alors que le suivi de la croissance par absorbance d'un milieu de culture liquide constitue une méthode parfaitement indiquée. Nous avons adapté à nos besoins une approche semi-automatisée de suivi de la croissance en micro-culture de 100 μ l par lecture de l'absorbance automatisée grâce à un lecteur de plaque multi-puits, appuyé par un algorithme mathématique que nous avons développé qui fournit des paramètres chiffrés décrivant la croissance des cellules tels que le temps de latence « λ », et le taux de croissance maximale « μ_m ». Nous avons effectué la validation de la méthode, et la mise au point des conditions à l'aide de trois agents endommageant l'ADN; le méthyl méthanesulfonate (MMS), la bléomycine (BLM) et les rayons UV, en utilisant des souches contrôles dont la sensibilité à ces agents est connue. Cette étape de validation nous a permis de démontrer la haute sensibilité de notre méthode, en plus de fournir des données quantitatives et objectives qui décrivent la croissance des cellules. Par la suite, nous avons procédé à un criblage ciblé d'une librairie de souches de levure pour identifier des gènes impliqués

dans la modification de la chromatine, qui affecteraient positivement ou négativement l'efficacité de réparation des dommages créés par les UV. Parmi les souches mutantes testés, nous avons identifié deux souches plus sensibles aux rayons UV, soit *gcn5Δ* et *spt10Δ*, et deux souches ayant une vitesse de récupération plus rapide, donc plus résistante, que la souche de type sauvage, soit *sir2Δ* et *rpd3Δ*.

**2.3 - A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells
to genotoxic agents in liquid cultures**

Martin Toussaint, Geneviève Levasseur, Julien Gervais-Bird, Raymund J.

Wellinger, Sherif Abou Elela and Antonio Conconi*

*Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculté de Médecine, Université de
Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada.*

KEY WORDS: DNA repair, Cell survival, methyl methanesulfonate, bleomycin,
ultraviolet light radiation, histone acetyltransferase, histone deacetylases

Abbreviations: BER, base excision repair; CPD, *cis-sin* cyclobutane pyrimidine dimer;
DSB, double strand break; HAT, histone acetyltransferase; HDAC, histone deacetylases;
HR, homologous recombination; MMS, methyl methanesulfonate; NER, nucleotide
excision repair; (6,4)PD; pyrimidine (6,4) pyrimidone dimers; SSB, single strand break;
UV, ultraviolet light.

* Corresponding author:

Abstract

The sensitivity of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to DNA damaging agents is better represented when cells are grown in liquid media than on solid plates. However, systematic assessment of several strains that are grown in different conditions is a cumbersome undertaking. We report an assay to determine cell growth based on automatic measurements of optical densities of very small (100 μ l) liquid cell cultures. Furthermore, an algorithm was elaborated to analyze large data files obtained from the cell growth curves, which are described by the growth rate - that starts at zero and accelerates to the maximal rate (μ_m) - and by the lag time (λ). Cell dilution spot test for colony formation on solid media and the growth curve assay were used in parallel to analyze the phenotypes of cells after treatments with 3 different classes of DNA damaging agents (methyl methanesulfonate, bleomycin, ultraviolet light). In these experiments the survival of the WT (wild type) and a number of DNA repair-deficient strains were compared. The results show that only the cell growth curve assay could uncover subtle phenotypes when WT cells, or mutant strains that are only weakly affected in DNA repair proficiency, were treated with low doses of cytotoxic compounds. The growth curve assay was also applied to establish whether histone acetyltransferases and deacetylases affect the resistance of yeast cells to UV irradiation. Out of 20 strains tested the *sir2 Δ* and *rpd3 Δ* cells were found to be more resistant than the WT, while *gcn5 Δ* and *spt10 Δ* cells were found to be more sensitive. This new protocol is sensitive, provides quantifiable data, offers increased screening capability and speed compared to the colony formation test.

1. Introduction

DNA damage can alter gene expression, induce mutations and promote the development of cancer in multi-cellular organisms [1]. Therefore, monitoring the effects of DNA damaging agents on cell growth is of considerable interest to cancer research [2-4]. Among other systems, the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been used as biological model to study DNA repair. The strength of the yeast model rests on the ease of its genetic manipulation and on the large degree of homology between genes in yeast and humans [5]. To help determine the function of a great number of yeast genes, an international consortium has undertaken the systematic deletion of all ~4,800 known non-essential open reading frames (ORFs) [6-8]. In parallel, methods have been developed to select for phenotypes of yeast strains lacking those ORFs. Often, this involves visual inspection, and subsequent subjective evaluations, of colonies growth on agar plates [9-11].

The survival of cells after treatments with DNA damaging agents is usually monitored by growth of colonies on agar plates. However, counting the number or measuring the size of yeast colonies lacks the sensitivity that is necessary to determine the effect of low doses of cytotoxic compounds. Additionally, its lack of sensitivity is a drawback when screening for genes that are only indirectly involved in DNA repair. In fact, DNA repair in cells missing those genes could be delayed by only a few hours, a phenotype that cannot be detected by the colony formation assay, as it takes several hours for yeast to form colonies. Finally, the interpretation of colony formation on agar plates does not identify whether the colonies grew despite changes in growth rate and/or changes of the

lag time, which is measured from the moment when damaged cells stop division to the moment when they resume growth.

The phenotypic analyses of yeast in liquid cultures are more appropriate than on solid media. However, this approach is not widely used and only very few studies report its convenience when searching for genes in metabolic pathways [12]. Mostly, this is due to difficulties intrinsic to the assays. Such difficulties include the extended monitoring of growth over a long period of time and the large data sets generated by the analysis of many strains grown in different conditions. In the present study these problems were circumvented by the use of 96 well-plates and an appropriate plate reader that allows the incubation, shaking, measurement and continuous recording of the optical densities (ODs) of each well, for the duration of the growth experiments. This facilitates the analyses of a large number of cultures simultaneously and, thus, is applicable to large genetic screens. For the analyses of the data we have used an exponential curve and developed an algorithm corresponding to our specific needs to determine the cell growth parameters. The sensitivities of the growth curve assay and of the colony formation test were compared.

Three DNA damaging agents were employed: methyl methanesulfonate (MMS), bleomycin and ultraviolet light (UV); they induce different kinds of DNA lesions that, consequently, are removed by different DNA repair pathways. The rationale was to test the growth curve assay on yeast mutant strains for each repair pathway. The methylating agent MMS produces a variety of damaged DNA bases, with *N*₇-methylguanines constituting about 80% of the total [13,14]. In yeast, N-methylpurines are enzymatically removed by base excision repair (BER) [15-17], and cells deficient in BER are more

sensitive to MMS [18]. However, homologous recombination (HR) may also participate in the repair of methylpurines [16], as functional *RAD52* is necessary for effective HR and its absence affects the sensitivity of yeast to MMS [19].

Bleomycin is a radiomimetic drug that, in the presence of specific cofactors creates single strand breaks (SSB) and double strand breaks (DSB) by a concerted free radical attack on the sugar moieties [20]. The HR and post-replication DNA repair pathways are involved in repair of bleomycin-induced DNA lesions, and the difficulty of repairing DSB has been postulated to be the major factor in bleomycin's cytotoxicity [19,21-24]. Furthermore, DNA lesions induced by MMS and bleomycin cause replication blocks [25], that through the action of *RAD9* [26] result in delayed cell division [27,28]. The products of the *RAD9* and *RAD17* genes are believed to function in the first step of the signalling cascade that activates cell cycle arrest in response to DNA damage [29]. *RAD52*, *RAD9* and *RAD17* were selected as mildly sensitive control strains to test our methods using MMS and BLM damaging agents. It is known that these strains present intermediate sensitivity to these agents, and they revealed to be good candidates for the validation, as the method is designed to find low sensitive strains.

UV light induces the formation of two major photoproducts: *cis-sin* cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and (6-4) pyrimidine-pyrimidone dimers (6-4)PD [30,31], which are removed by nucleotide excision repair (NER) [32]. The yeast genes involved in NER can be divided into two classes; the first consists of *RAD1*, 2, 3, 4, 10, 14 and 25, and the second consists of *RAD7*, 16, 23 and *MMS19*. Mutations in genes of class 1 cause

severe UV sensitivity, whereas mutations in genes of class 2 cause moderate UV sensitivity [33].

In addition to assessing the effects of the three DNA damaging agents described above, we also used the growth curve assay to screen for yeast genes that could indirectly influence the repair of UV damage. To do this, each of the known histone acetyl transferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) genes, which modify chromatin structure and may thereby influence the rate of NER, was investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Yeast Strains

All the strains listed in Table 1 derive from BY4741 (MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) [8, 34], and all gene deletions were confirmed by PCR analysis; additional information are available in the *Saccharomyces* Genome Deletion Project's web site [[http://wwwsequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html](http://www.sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html)]. In addition, deletions in strains (*gcn5Δ, hat1Δ, hat2Δ, sas2Δ, sas3Δ, elp3Δ, nut1Δ, spt10Δ, hda1Δ, sir2Δ, hos1Δ, hos2Δ, hos3Δ, hst1Δ, hst2Δ, hst3Δ, hst4Δ, hpa2Δ, hpa3Δ*) were verified by Southern blots, using at least two restriction enzymes and a probe against the *KanMX4* resistance marker (data not shown). The *rpd3Δ* strain was constructed by one step PCR-deletion strategy [34], using an *rpd3Δ::KanMX4* cassette amplified from JS490 (Matα *his3Δ200 leu2Δ1 met15Δ0 trp1Δ63 ura3-167 RDN1::ty1-MET15 mURA3/HIS3 rpd3Δ::KanMX4*, ref) with RPD3-fwd 5'-GATGCAATGCTTAACGCC-3' and RPD3-rev

5'-GAATCAGATGAGGATAGGG-3'. The *rad52Δ* was constructed by the same one step PCR-deletion strategy using RAD52Δ-fwd 5'-GGAGGTTGCCAAGAAGCTGCTGAAGGTTCTGGTGGCTTTGGAGATTGTACTGAGAGTGCAC-3' and RAD52Δ-rev 5'-GTTTCGGCCAGGAAGCGTTTCAAGTAGGCTTGCGTGCATGCTGTGCGGTATTT CACACCG-3' with 1 ng of pRS305 [34].

Table 1.

Strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	[34]
HAT		
<i>gcn5Δ</i>	Same as BY4741 <i>gcn5Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>hat1Δ</i>	Same as BY4741 <i>hat1Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>hat2Δ</i>	Same as BY4741 <i>hat2Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>sas2Δ</i>	Same as BY4741 <i>sas2Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>sas3Δ</i>	Same as BY4741 <i>sas3Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>elp3Δ</i>	Same as BY4741 <i>elp3Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>nut1Δ</i>	Same as BY4741 <i>nut1Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>spt10Δ</i>	Same as BY4741 <i>spt10Δ::KanMX4</i>	[8]
HDAC		
<i>hda1Δ</i>	Same as BY4741 <i>hda1Δ::KanMX4</i>	[8]

Strain	Genotype	Reference
<i>sir2Δ</i>	Same as BY4741 <i>sir2Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>hos1Δ</i>	Same as BY4741 <i>hos1Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>hos2Δ</i>	Same as BY4741 <i>hos2Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>hos3Δ</i>	Same as BY4741 <i>hos3Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>hst1Δ</i>	Same as BY4741 <i>hst1Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>hst2Δ</i>	Same as BY4741 <i>hst2Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>hst3Δ</i>	Same as BY4741 <i>hst3Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>hst4Δ</i>	Same as BY4741 <i>hst4Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>hpa2Δ</i>	Same as BY4741 <i>hpa2Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>hpa3Δ</i>	Same as BY4741 <i>hpa3Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>rpd3Δ</i>	Same as BY4741 <i>rpd3Δ::KanMX4</i>	This study
<i>rad9Δ</i>	Same as BY4741 <i>rad9Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>rad17Δ</i>	Same as BY4741 <i>rad17Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>rad52Δ</i>	Same as BY4741 <i>rad52Δ::LEU2</i>	This study
<i>rad1Δ</i>	Same as BY4741 <i>rad1Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>rad7Δ</i>	Same as BY4741 <i>rad7Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>rad16Δ</i>	Same as BY4741 <i>rad16Δ::KanMX4</i>	[8]
<i>rad26Δ</i>	Same as BY4741 <i>rad26Δ::KanMX4</i>	[8]

2.2. Media and growth conditions

The yeast strains were grown exponentially ($\sim 0.7 \times 10^7$ to 10^7 cells/ml) in yeast extract-peptone-dextrose (YEED) at 26°C and under continuous rotation. Then, cells were collected by centrifugation, re-suspended in sterile water to 0.8×10^7 cells/ml and treated with the DNA damaging agents (see below). Each well of 96-well non-coated polystyrene microplates (Corning incorporated) containing 95 μ l of fresh YEED was inoculated with 5 μ l of treated, or mock treated, yeast cultures (corresponding to 4×10^4 cells). The samples were prepared in triplicate and cell growth was monitored with a fully automated PowerWave microplate scanning spectrophotometer (Bio-Tek). The optical density was automatically recorded using KC4 microplate data analysis software (Bio-Tek), and the software was programmed with the following settings: the optical density was measured at 660 nm, incubation was kept at 30°C, $\pm 0.1^\circ\text{C}$, the microplates were subjected to continuous shaking at intensity 2, during 595 seconds. Readings were done every ten minutes during a 48 hour period. Each number corresponds to numerical entry in the software. The whole set of experiments were repeated at least 3 times and, in parallel, serial dilutions of the same cells were spotted onto YEED agar plates (see below).

2.3. Treatments with methyl methanesulfonate (MMS) and bleomycin

MMS (Sigma, cat no. M 4016) was used as stock solution, and bleomycin (MeadJohnson) was dissolved in sterile water to a stock solution of 5 U/ml and kept at -20 °C. Chronic exposures of yeast cultures to MMS and bleomycin were done as follows: triplicates of 5 μ l of cell suspensions (0.8×10^7 cells/ml in sterile water) were used to inoculate the wells of a microplate containing 95 μ l of YEED media and the indicated amounts of MMS or

bleomycin (see Results). The microplates were incubated as described in Media and growth conditions. In parallel, ten fold serial dilutions (0.8×10^7 , 0.8×10^6 , 0.8×10^5 , 0.8×10^4 and 0.8×10^3 cells/ml) were prepared and 5 μ l of each dilution (corresponding respectively to 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 and 4×10^0 cells) were spotted on YEPD plates containing the indicated concentration of MMS or bleomycin. The plates were incubated at 30°C for 48 h. To treat cells with acute exposures of MMS, 1 ml of yeast cultures in water was collected by centrifugation, resuspended in 1 ml YEPD (0.8×10^7 cells/ml) containing the indicated concentration of MMS and incubated at 30°C for 90 minutes under continuous rotation. Then, cells were harvested by centrifugation, washed twice and re-suspended in 1 ml of sterile water. N.B., no significant growth was detected during this time (data not shown). As described above, 5 μ l of cell suspensions (4×10^4 cells) were used to inoculate 95 μ l of fresh YEPD (without DNA damaging agents). In parallel, ten fold serial dilutions (0.8×10^7 , 0.8×10^6 , 0.8×10^5 , 0.8×10^4 and 0.8×10^3 cells/ml) were prepared and 5 μ l of each dilution were spotted (corresponding respectively to 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 and 4×10^0 cells) on YEPD plates (without DNA damaging agents).

2.4. UV irradiation

Yeast cells, 300 μ l of 0.8×10^7 cells/ml in sterile water, were placed on a glass plate and UV irradiated (primary 254 nm) with 20, 80 and 150 J/m², as measured with a UVX radiometer (Ultra-Violet Products, Upland, US). Triplicates of 5 μ l of UV irradiated, or mock treated, cell suspensions were used to inoculate the wells of a microplate containing 95 μ l of YEPD media.

The microplates were incubated as described in Section 2.2 and, in parallel, 5 μ l of ten fold serial dilutions (0.8×10^7 , 0.8×10^6 , 0.8×10^5 , 0.8×10^4 and 0.8×10^3 cells/ml) were spotted on YEPD plate (corresponding respectively to 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^1 and 4×10^0 cells). The plates were incubated in the dark to avoid activation of photolyase, at 30°C for 48 h.

2.5 Data collection and analysis of growth curves

After exponential growth, yeast cells do not reach an asymptotic plateau but continue with a slow growth phase (Fig. 1). This last phase of growth changes the general shape of the curves, which become unsuitable to any fit with standard equations [35,36]. Therefore, we used an exponential curve to analyze the cell growth parameters. This mathematical model provides a good approximation to analyze the growth curves and to determine the growth parameters μ_m (the phase in which the growth rate starts at zero and accelerates to the maximal rate) and λ (the lag time that reflects the time cells need to recover from the dilution and/or DNA damage). The raw data were exported from the KC4 software to Excel (Microsoft) and loaded into private database for automatic calculation of the growth parameters. Each operation is described here.

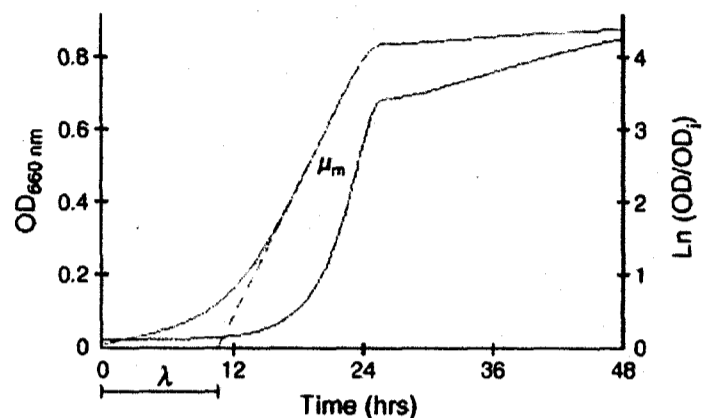


Figure. 1. Calculation of growth parameters. Cell concentrations are measured at different times (in hours) by optical density (OD) at 660 nm (raw OD curve; black). Cell growth is represented by $\ln(OD/OD_i)$, where OD_i is the initial OD (Ln curve; red). The maximal growth rate (μ_m) corresponds to the maximal slope of the Ln curve, and the cell doubling time at μ_m is defined by $\ln(2)/\mu_m$. The lag time (λ) corresponds to the intersection of the maximal slope of the Ln curve with the x-axis.

Remove blank. A blank value of 0.07 has been subtracted from the raw OD values to give the corrected ODs. When a raw OD is smaller or equal to the blank value, a corrected OD of 0.001 (the smallest OD detectable) is used.

Logarithmic transformation. Corrected ODs are divided by the initial OD (calculated by averaging the first five ODs) and transformed into a growth curve by applying natural logarithm.

Smooth curve. A smoothing procedure is applied to the corrected ODs by averaging each point with its eight closest neighbours.

Calculate slopes. The best estimation of the slope of each point was obtained by calculating the slope between the two fourth neighbouring points on each side.

Identify exponential growth limits. To avoid calculation of doubling time and lag time from irrelevant portion of the growth curve, we needed to establish the limits of the

exponential growth. For this, the flex point of the smoothed OD curve, corresponding to its maximal slope, is calculated. The lower limit is established by finding the last point, before the flex point, that exceeds an OD₆₆₀ of 0.02 and with a variation of the slope (slope of the slope) that exceeds 5 % of the maximal variation of the slope of the curve. The upper limit is established by finding the first point, past the flex point, which answers one of the two following conditions; 1- where the variation of the slope of the curve is null or positive, 2- where the slope of the curve is smaller than 10% of the maximal slope, plus two hours.

Calculate maximal growth rate, doubling time and lag time. Since growth rate is given by the slope of the log transformed ODs, maximal growth rate is identified as the maximum value of the curve within the previously identified exponential growth limit. The doubling time is calculated with $[\ln(2)/\text{maximal growth rate}]$. Lag time is given by calculating the time at which the tangent to the maximal growth rate on the growth curve intersects the horizontal axis (Fig. 1). [The software is freely available upon request]. We determined the number of cells by measuring the optical densities (OD_{660nm}) as a function of time (min), and plotted as raw OD curves. The growth curve corresponds to the logarithmic curve (Fig. 1). Visual inspection of raw OD curves with its limits, and associated growth curves is made to ensure proper analysis.

3. Results

3.1. Sensitivity of yeast cells to acute exposure to methyl methanesulfonate (MMS) as measured by the formation of colonies and by growth curves analysis

WT, *rad9Δ*, *rad17Δ* and *rad52Δ* yeast strains were treated by acute exposure to MMS as described in Methods. The results obtained by plating the cells indicate that *rad9Δ* and *rad17Δ* cells are as sensitive as the WT to MMS concentrations of 0.01% and 0.025% (Fig. 2A). At 0.05% the two *rad* strains appear more sensitive than the WT. In parallel, we investigated the cell response to MMS with the growth curve assay. The results (Fig. 2B; OD curves) show that cell sensitivity to MMS is more apparent when measured with the growth curve assay than with the spot test (compare Fig. 2B with Fig. 2A). For instance, sensitivity of the WT strain to MMS is revealed by the increased amount of time needed for the treated cultures to reach $OD_{660} \sim 0.4$ (Fig. 2B, see time shifts from the broken line from 0 to 0.05% MMS). For the *rad* cells, sensitivity to MMS is also revealed by the increased amount of time needed for the treated cultures to reach $OD_{660} \sim 0.4$ and from the retardation of OD curves compared to WT (Fig. 2B, compare OD curves of WT and *rad* strains, before and after exposures to MMS). Additional information on the MMS cytotoxicity is gained by calculating the cell growth parameters (Figs. 2D and 2E) obtained from the growth curves (Fig 2C). Mock treated *rad9Δ* and *rad17Δ* cells have similar doubling times (*rad9Δ*: 1.35, *rad17Δ*: 1.28 and WT: 1.31 hours; Fig. 2D) and comparable lag times (*rad9Δ*: 1.15, *rad17Δ*: 0 and wt: 0 hours; Fig. 2E) as the WT. When exposed to 0.01% and 0.025% of MMS, the doubling times increased for *rad9Δ* and *rad17Δ* but not for WT cells (Fig. 2D). Interestingly, at these doses the lag times are only slightly affected (Fig. 2E). Conversely, when cells were exposed to high doses of MMS (0.05%), both the doubling and the lag times changed.

The same set of experiments was done with the *rad52Δ* strain, and the participation of HR in repair of MMS-induced DNA lesions is shown by its sensitivity, which is readily visible in the spot test at the lowest concentration of 0.01% (Fig. 2A) [19]. The sensitivity of *rad52Δ* is even more evident in the growth curve assay (Figs. 2B and 2C). Furthermore, unlike for the *rad9* and *17Δ* cells, the data analyses show that the lag and the doubling times are both affected for the *rad52Δ* strain (Figs. 2D and 2E). Finally, it is known that *rad52Δ* cells grow somewhat slower than WT cells [37]. This phenotype is detectable with the growth curve assay but not with the spot test (compare Fig. 2B with Fig. 2A; 0% MMS). The biphasic shape of the logarithmic growth curves is discussed below.

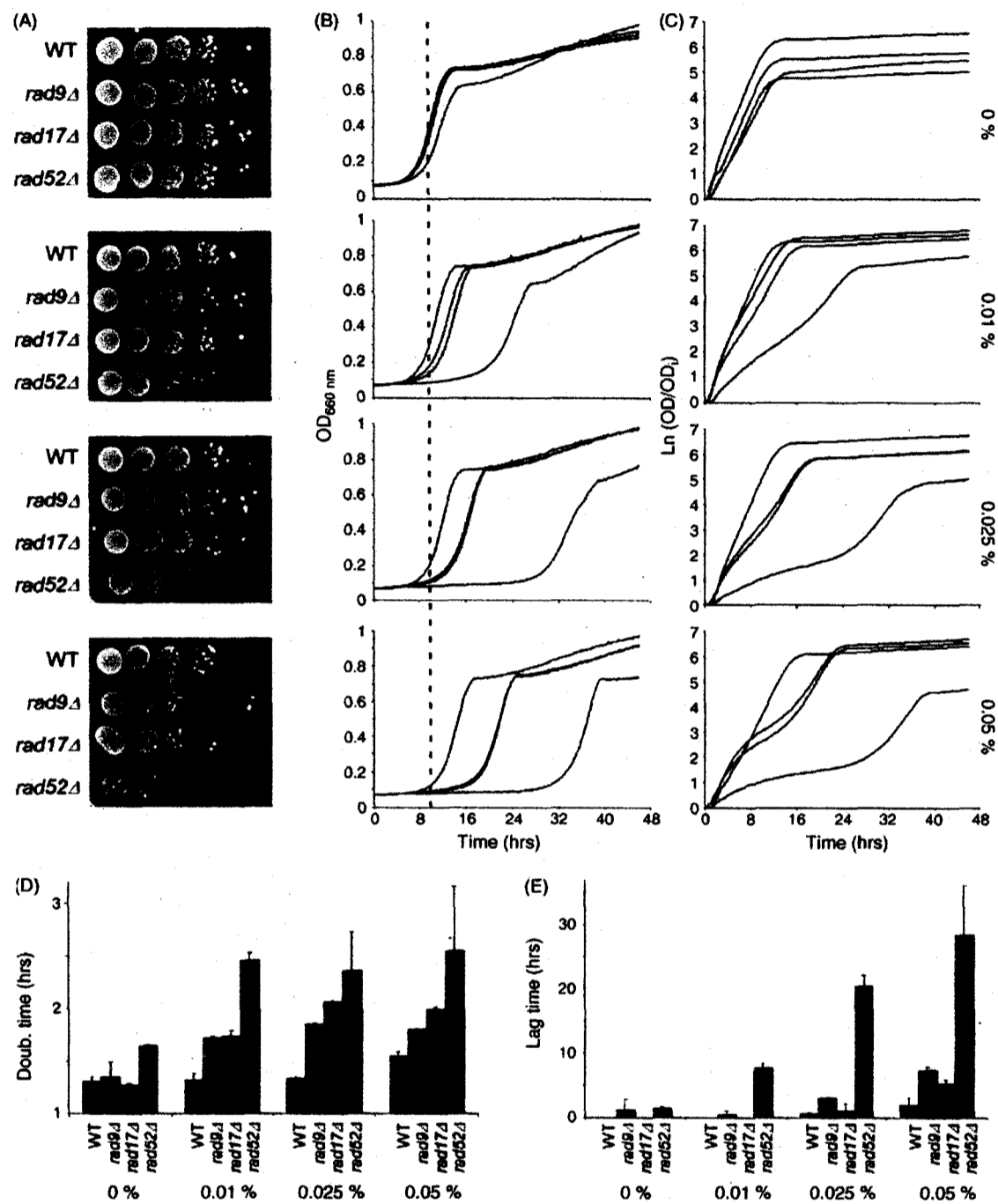


Fig. 2. Acute exposure of WT, *rad9Δ*, *rad17Δ* and *rad52Δ* cells to MMS. Exponentially growing cells were resuspended at 0.8×10^7 cells/ml in YEPD media containing increasing concentrations of MMS (0, 0.01, 0.025 and 0.05%) and incubated for 90 min at 30 °C. (A) Spot test assay. Ten-fold serial dilutions of treated cells were spotted (each spot contained 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 and 4×10^0 cells) on YEPD plates and incubated at 30 °C for 48 h. (B) Analysis of cell concentration by OD₆₆₀. In the wells of 96-well plate, 4×10^4 cells were deposited in triplicate and cell growth was measured every 10 min for 48 h. (C) Growth curves were derived from the raw OD curves. (D) The cell doubling times (in hours) are measured at the maximal growth rate (μ_m), before and

after exposure to different concentrations of MMS. (E) The lag times (λ) are shown in hours. The color codes of the OD and the growth curves (B and C) correspond to the different yeast strains and are as labelled in (A). Values in (D) and (E) represent the mean \pm 1 S.D. of three independent growth curves of cells treated at the same time with MMS.

3.2. Sensitivity of yeast cells to chronic exposure to methyl methanesulfonate (MMS) as measured by the formation of colonies and by growth curves analysis

WT, *rad9* Δ , *rad17* Δ and *rad52* Δ cells were also assayed under conditions of chronic exposure to MMS, either on plates or in liquid media. The results obtained with the spot test show that the WT, *rad9* Δ and *rad17* Δ cells are similarly sensitive to chronic exposures to MMS (Fig. 3A). Conversely, the growth curve assay uncover clear dose-dependent differences (Figs. 3B and 3C); *rad9* Δ being the most sensitive, followed by *rad17* Δ and then WT. At the highest concentration of 0.02%, the WT strain recovers cell growth and reaches OD₆₆₀ ~ 0.4 with a delay of 18.9 hours compared to non-treated cells (Fig. 3B). The *rad9* Δ and *rad17* Δ strains do not grow at this concentration, and in the presence of 0.005% and 0.01% MMS they show only very slow recovery (Figs. 3B and 3C). The growth parameters show that in the presence of 0.005% MMS the doubling times increase for the WT and the two *rad* strains, whereas the lag times are not affected (Figs. 3D and 3E). [It is noted that at 48 hours the growth curves for *rad9* Δ and *rad17* Δ cells in the presence 0.01 % and 0.02 % MMS are incomplete. Thus, the doubling and lag times were not calculated (Figs. 3D and 3E)].

As during acute exposures, chronic exposures to MMS show that the *rad52Δ* strain is more sensitive than the *rad9Δ* and *17Δ* strains. Furthermore, its sensitivity is higher under chronic than under acute exposure (compare Figs. 2A and 2B with 3A and 3B, WT and *rad52Δ* strains), and in liquid media no growth can be detected even when cells are

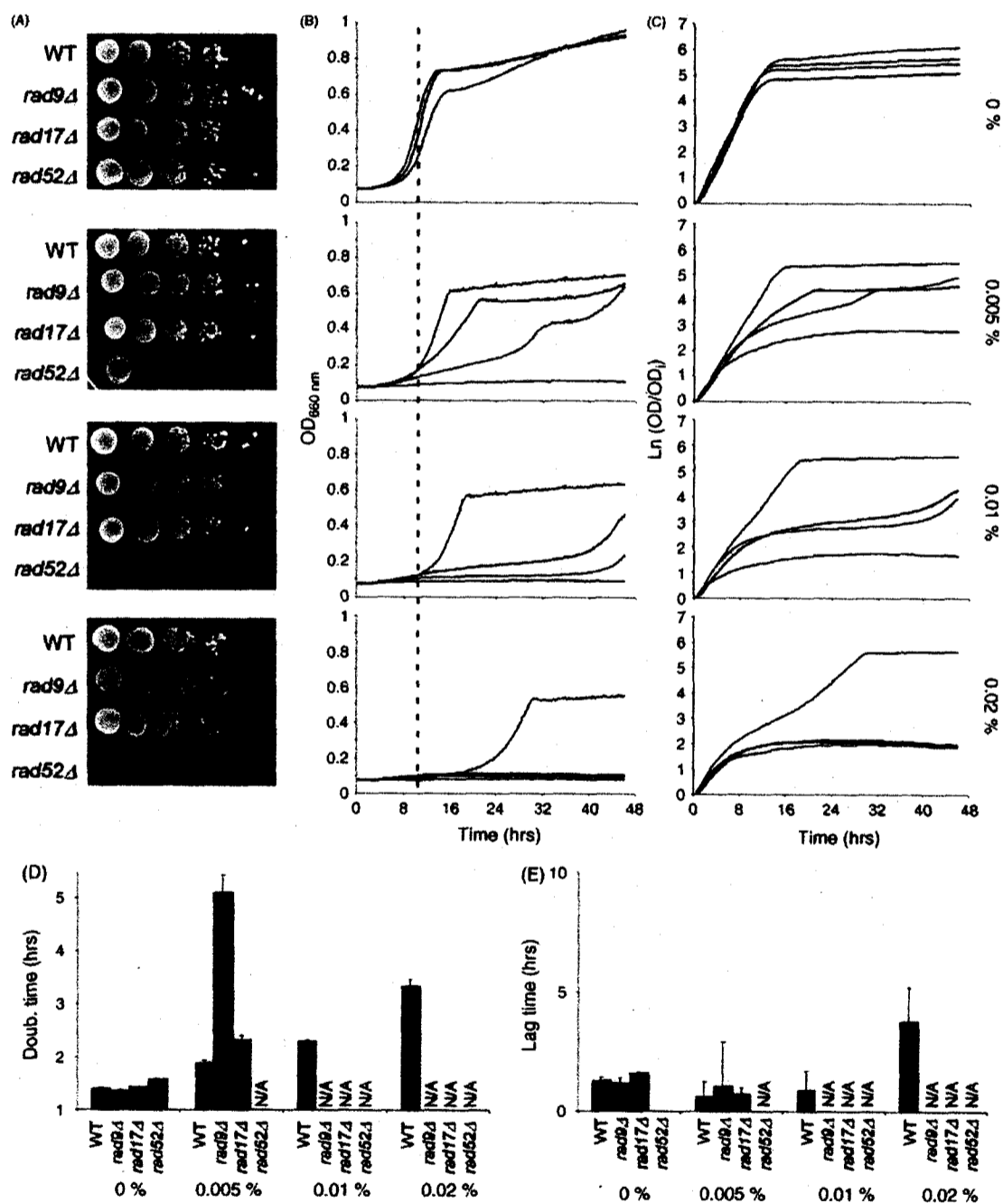


Fig. 3. Chronic exposure of WT, *rad9Δ*, *rad17Δ* and *rad52Δ* cells to MMS. (A) Ten-fold serial dilutions (4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 and 4×10^0 cells) were spotted on YEPD plates containing indicated concentrations of MMS (0, 0.005, 0.01 and 0.02%) and incubated at 30 °C for 48 h. (B) In parallel, 4×10^4 cells were deposited in triplicate in the wells of 96-well plate containing YEPD with increasing amounts of MMS as in the plates (A) and growth was measured every 10 min for 48 h. (C)–(E) As in Fig. 2, and the color codes of the curves (B and C) correspond to the different yeast strains and are as labelled in (A). Values in (D) and (E) represent the mean \pm 1 S.D. of three independent growth curves.

exposed to the lowest dose of 0.005%. Again, the growth curves have a biphasic shape (see Discussion).

3.3. Sensitivity of yeast cells chronically exposed to bleomycin as measured by the formation of colonies and by growth curve analysis

WT, *rad9Δ*, *rad17Δ* and *rad52Δ* cells were chronically exposed to bleomycin as described in Methods. The results obtained with the spot test suggest that the WT, *rad9Δ* and *rad17Δ* cells are similarly sensitive to bleomycin (Fig. 4A). However, the growth curve assays for the 3 strains show that *rad9Δ* and *rad17Δ* cells are more sensitive to bleomycin than WT (Figs. 4B and 4C). As with MMS, during chronic exposures to bleomycin the doubling times are affected more than the lag times (Figs. 4D and 4E). For the *rad52Δ* strain (deficient in HR) sensitivity to bleomycin was clearly detected by the spot test (Fig. 4A) [19]. Thus, the *rad52Δ* strain served as a positive control for the growth curve assay which clearly measured its high sensitivity to bleomycin. Although less prominent than shown in Figures 2C and 3C the growth curves are biphasic (see Discussion). [It is noted that the lag and the doubling times could not be

calculated for *rad52Δ* cells grown in the presence of 6 and 10 mU/ml bleomycin, since there was little or no increase in OD measurements over the course of the measurements].

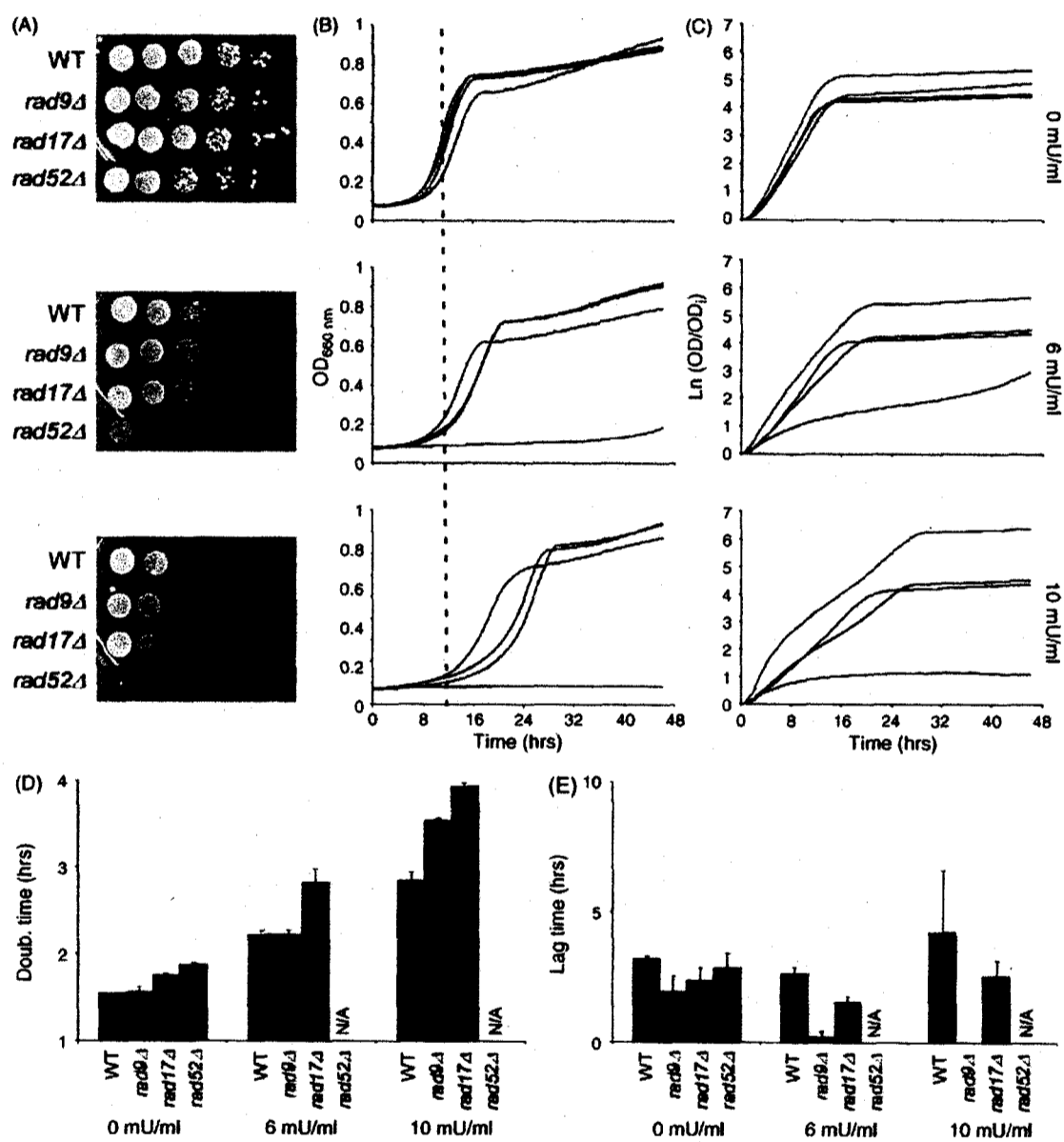


Fig. 4. Chronic exposure of WT, *rad9Δ*, *rad17Δ* and *rad52Δ* cells to bleomycin. (A) Cells were prepared as described in Fig. 3 and spotted on YEPD plates containing 6 and 10 mU/ml of bleomycin or mock treated, and incubated at 30 °C for 48 h. (B) In parallel, 4×10^4 cells were deposited in triplicate in the wells of 96-well plate containing YEPD with increasing amounts of bleomycin as in the plates (A) and growth was measured every 10 min for 48 h. (C)–(E) As in Fig. 2, and the color codes of the curves (B and C)

correspond to the different yeast strains and are as labelled in (A). Values in (D) and (E) represent the mean \pm 1 S.D. of three independent growth curves.

3.4. Sensitivity of yeast cells to UV irradiation as measured by the formation of colonies and by growth curves analysis

WT, *rad1* Δ *rad7* Δ , *rad16* Δ and *rad26* Δ cells were irradiated with different doses of UV light, and their UV sensitivities compared by the spot test and the growth curve assay. The results obtained by plating the cells show that *rad7* Δ and *rad16* Δ are more sensitive than WT to UV doses of 80 and 150 J/m². The *rad26* Δ strain is visibly more sensitive than WT only at the highest dose of 150 J/m² (Fig. 5A). As expected from published data [33, 38], the UV sensitivity of the *rad1* Δ strain is already detected at the lowest UV dose of 20 J/m².

The growth curve assay more clearly uncovers the inverse correlation between UV dose and mitotic competence (Fig. 5B, time shifts from the broken line), as well as the higher sensitivity of *rad* mutants (Fig. 5B; compare WT and *rad* strains, before and after irradiation). Most importantly, the sensitivity of the growth curve assay becomes particularly evident at the lowest UV dose (20 J/m²), where all *rad* mutants appear more sensitive than the WT. After a long time delay (~ 25 hours) *rad1* Δ cells resume normal cell growth. This corresponds with the survival tests of class 1-*rad* mutants measured in previous work, where $\sim 10^{-4}$ % of colonies formed after similar UV radiance [39]. The lag

times are mainly affected in the *rad* mutants (Figs. 5C, 5D and 5E), and the growth curves of *rad7Δ* and *rad26Δ* strains at 20 and 80 J/m² show two phases (see Discussion).

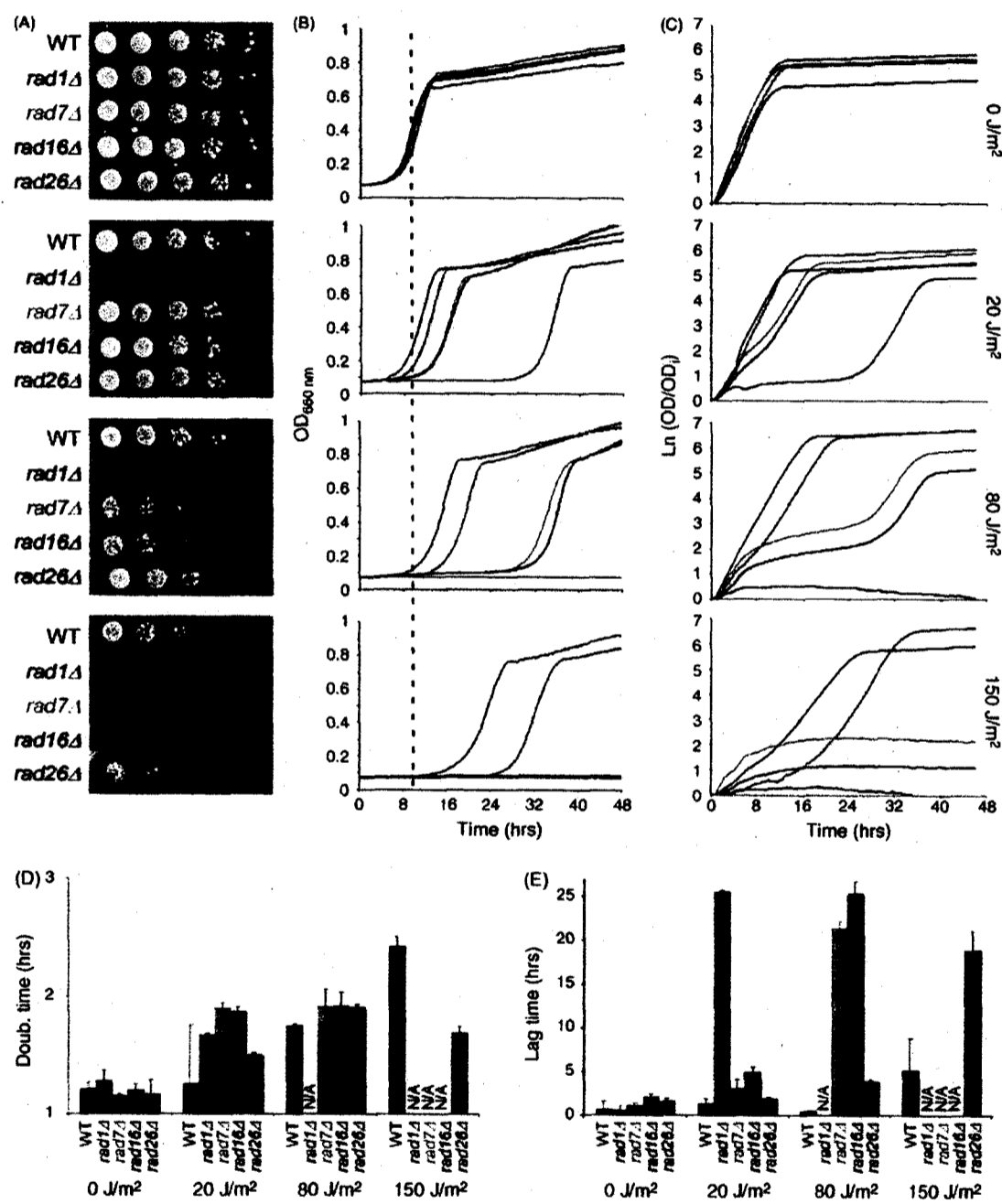


Fig. 5. Exposure of WT, *rad1Δ*, *rad7Δ*, *rad16Δ* and *rad26Δ* cells to UV irradiation. Exponentially growing cells were irradiated with doses of 20, 80 and 150 J/m² of UV light. (A) Ten-fold serial dilutions of control and UV-irradiated cells were spotted on YEPD plates and incubated at 30 °C for 48 h. (B) Analysis of cell concentration by OD₆₆₀.

In triplicate in the wells of 96-well plate, 4×10^4 cells were deposited and growth was measured every 10 min for 48 h. (C)–(E) As in Fig. 2, and the color codes of the curves (B and C) correspond to the different yeast strains and are as labelled in (A). Values in (D) and (E) represent the mean \pm 1 S.D. of three independent growth curves.

3.5. Screening for histone acetylases and deacetylases that alter time of cell recovery after UV irradiation

We analyzed the UV sensitivity of yeast strains carrying deletions in one of each of the known histone acetyltransferases (HAT) and histone deacetylases (HDAC) genes (Table 1). The results obtained by plating the cells suggest that the *gcn5 Δ* , *spt10 Δ* , *sir2 Δ* and *rpd3 Δ* strains are as sensitive as WT to UV doses between 20 and 80 J/m² (Fig. 6A). We note that before UV irradiation *spt10 Δ* form fewer and smaller colonies than the other strains (Fig. 6A; 0 J/m²). Although at 150 J/m² it is not clear whether *gcn5 Δ* and *spt10 Δ* are more sensitive than the WT, the *sir2 Δ* and *rpd3 Δ* strains appear more resistant at these UV doses (Fig. 6A, 150 J/m²). The growth curve assay shows that the UV sensitivity of all strains was dose dependent (Fig. 6B, see time shifts from the broken line from 0 to 150 J/m²), and at 150 J/m² the *sir2 Δ* and *rpd3 Δ* cells recover faster compared to WT cells (Fig. 6B; 150 J/m²). Moreover, the slow growth phenotype of un-irradiated *gcn5 Δ* and *spt10 Δ* cells can be measured by the growth curves assay (Fig. 6B; 0 J/m²) and, thus, be taken into consideration when determining their UV phenotypes; the spot test does not include this possibility. Compared to WT, irradiated *gcn5 Δ* and *spt10 Δ* cells take, respectively, an additional 5 and 6 hours to reach OD₆₆₀ ~ 0.4 at 150 J/m² (Fig. 6B; WT, *gcn5 Δ* and *spt10 Δ* , compare shifts from the broken line at 0 and 150 J/m²). As

described above (Figs. 5D and E), UV irradiation induces changes in both the doubling and the lag times (Figs. 6D and E).

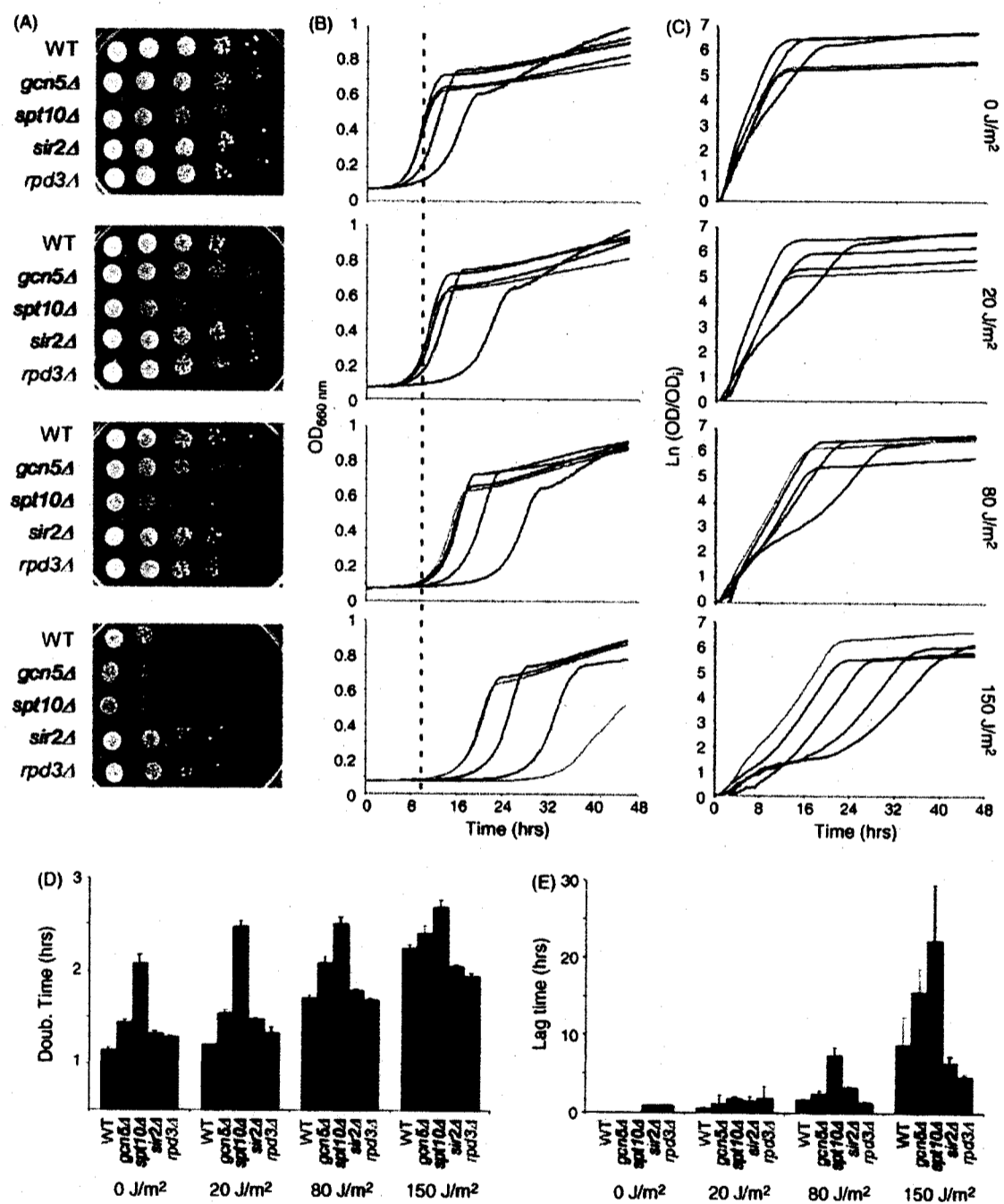


Fig. 6. Exposure of WT, *gcn5Δ*, *spt10Δ*, *sir2Δ* and *rpd3Δ* cells to UV irradiation. Exponentially growing cells were UV irradiated and cell survival were monitored as described in Fig. 5. (A) Spot test assay. (B and C) Analysis of cell concentration by OD₆₆₀. (D and E) As in Fig. 2, and the color codes of the curves (B and C) correspond to

the different yeast strains and are as labelled in (A). Values in (D) and (E) represent the mean \pm 1 S.D. of three independent growth curves.

In summary, the results of the screening for UV sensitivity showed that from the eight HAT (*gnc5 Δ* , *hat Δ* , *hat2 Δ* , *sas2 Δ* , *sas3 Δ* , *elp3 Δ* , *nut1 Δ* and *spt10 Δ*) and twelve HDAC (*hda1 Δ* , *sir2 Δ* , *hos1 Δ* , *hos2 Δ* , *hos3 Δ* , *hst2 Δ* , *hst2 Δ* , *hst3 Δ* , *hst4 Δ* , *hpa2 Δ* , *hpa3 Δ* and *rpd3 Δ*) mutant strains analyzed (data not shown), only *gnc5 Δ* , *spt10 Δ* , *sir2 Δ* and *rpd3 Δ* cells displayed phenotypes after UV irradiation. At the highest UV dose, the 2 HAT knockouts needed more and the 2 HDAC knockouts needed less time to recover than WT cells.

4. Discussion

The survival of yeast is often established by their ability to form colonies on solid media. In this manuscript we have optimized an alternative way to measure cell recovery that is based on continuous monitoring of cell growth in liquid cultures. The assay was applied to determine the sensitivity of yeast cells to DNA damaging agents, and the results show that it is a highthroughput protocol, which produces quantifiable data and it includes increased screening capability, speed and sensitivity. For instance, the sensitivity of WT cells to the three DNA damaging agents tested was detected at doses that are generally below the threshold for detection by the spot test. This is explainable, since DNA repair in WT cells is very efficient and most of the lesions are removed within few hours after induction of DNA damage [15,40]. On the other hand, it takes 24~48 hours for cells to form colonies. Therefore, in the presence of small amounts of DNA damage, cells have

time to repair the damage and form colonies in an indistinguishable fashion compared to undamaged controls. Similarly, the growth curve assay was more sensitive than the spot test when cell survival was followed in DNA repair mutants having slower but not completely abrogated DNA repair. When cells were exposed chronically to MMS, the spot test indicated that all strains were equally resistant to MMS, even at the highest concentration tested (Fig.3 A). However, the growth curve assay demonstrated that the two mutants were much more sensitive than the WT strain (Figs. 3 B and C), and that at 0.02% MMS the WT cells were also highly sensitive to MMS. Although we cannot fully explain the difference between phenotypes of cells grown on plates and in liquid media, it is possible that the latter growth condition provides for a more consistent and even contact of cells with MMS preventing the localised depletion of the tested agent that may occur on plates. Therefore, the growth curve assay could more truly reflect the cytotoxicity of MMS. In the same set of experiments, WT cells exposed to 0.01% MMS and to 10 mU/ml bleomycin showed similar retardation of cell growth. On the other hand, at these concentrations the *rad9Δ* and *rad17Δ* cells were more affected by the presence of N-methylpurines than by the presence of DNA strand breaks. These results suggest that the growth curve assay could give a first approximation of the toxicity of DNA damaging compounds.

As an initial application of the growth curve assay, we screened for a class of mutants lacking proteins that could be indirectly involved in NER - such as chromatin modifying enzymes that may affect the rate of repair rather than overall efficiency - and, therefore, expected to have only very small UV phenotypes when assayed by spot test. In eukaryotic cells, the DNA is packaged into nucleosomes and into the higher-order structures of

chromatin, which in general are an impediment to nuclear processes such as NER [41]. This has led to the hypothesis that chromatin structure might be modified to facilitate DNA repair. Indeed, the yeast histone acetyltransferase (HAT) Gcn5p was found to play a role during NER of the *MFA2* gene, although not during NER of the overall genome [42,43]. Thus, it remains to be determined whether Gcn5p and/or, other HATs enhance NER at other loci. Furthermore, from these observations it was also suggested that NER could be affected in strains carrying deletions of genes coding for histone deacetylases (HDAC). If so, removal of DNA damage would be expected to be slower in strains carrying deletions of HAT genes and faster in strains carrying deletions of HDAC genes. Within all the HAT and HDAC mutants tested, only *gcn5Δ*, *spt10Δ*, *sir2Δ* and *rpd3Δ* cells reproducibly showed a phenotype that was different from WT. These results justify future investigation for possible links between these proteins and NER.

To analyze the data we considered a number of model curves that have been previously described to determine the cell growth parameters by best curves fit [35,36]. However, under our growth conditions the yeast cells did not follow any of these growth models. This is because, after exponential growth, cells did not reach an asymptotic plateau but continued with a slow growth phase (Fig. 1). This last phase of growth changes the general shape of the curves such that they become difficult to fit with any of the standard equations [35,36]. Therefore, we used an exponential curve to analyze the parameters of cell growth. This mathematical model does not accommodate reductions in cell growth due to intra-specific competition for nutrients at the late stage of the growth phase. However, it does provide a good approximation for the analysis of the growth curves obtained and allowed us to determine the growth parameters most relevant to the

description of the behavior of cells after applications of genotoxic compounds. Two cell growth parameters were calculated for each curve: 1) the doubling time which is calculated from the maximal growth rate and corresponds to the average of the doubling times of all cells in the population and, 2) the lag time which is calculated from the intersection of the tangent of the maximal growth rate with the x-axis. This parameter represents a combination of the time needed for the cells to recover (e.g. after the insult with cytotoxic compounds) and the number of cells that are able to divide. Thus, three different types of outcomes can be expected: 1) only the lag time is affected, 2) only the doubling time is affected and, 3) both the lag time and the doubling are affected. Interestingly, our analyses showed that the type of DNA damaging agent used, its concentration and the length of treatment could influence which of these outcomes occurred. Future tests of a variety of DNA damaging compounds will determine if the cell growth parameters can be used to classify the genotoxic agents and to predict the corresponding DNA repair mechanisms.

The growth curves of yeast cultures treated with the DNA damaging agents are biphasic. Although very small increases in OD are not visible in the plots, these were amplified by the logarithmic transformation and are described in the first growth phases (e.g., Figs. 5C, *rad7* Δ and *16* Δ at 80 J/m²). When present, this first phase of the growth curve was not taken into consideration for the calculation of the growth parameters, as it is likely the result of increased light scattering due to enlarged and multi-budded cells (observed under the microscope; data not shown). We suggest that these metabolically competent cells increase in volume but are unable to divide until the completion of DNA repair. Indeed, it was previously shown that a proportion of irradiated *rad7* Δ cells are metabolically

competent but unable to form colonies on solid media [39]. As DNA repair proceeds to completion, cell division resumes and this process is described by the second growth phase. Conversely, when cells sustain lethal damage, there is no cell enlargement and the curves are flat, as observed for UV-irradiated *rad1Δ* cells at 80 and 150 J/m². It is worth reporting that the doubling times of cells grown in very small volumes and in micro plates is similar to the doubling times of cells grown in culture flasks (data not shown). On the other hand, the growth of yeast strains that form clumps as they divide cannot be analyzed. In such instances, the readings of the absorptions are not precise and the OD curves become unpredictable (data not shown). Finally, in addition to test the three DNA damaging agents described in this study, the growth curve assay has been successfully used in our laboratories to screen for a number of other compounds such as: benomyl (depolymerization of microtubules), H₂O₂ (stress response), calcofluor and NaCl (cell wall biosynthesis inhibitors), cycloheximide and caffeine (inhibitors of amino acid synthesis), cyclosporin A (immunosuppressant) and ketoconazol (antifungal); on WT and on mutant strains known to be sensitive to the drugs (unpublished data; J. Parenteau).

5. Acknowledgements

We thank Dr K. Kobryn for critical reading of the manuscript. We also wish to acknowledge contributions from Dr. R. Madden and D. Brunelle, who along with J.G-B (supported by Génome Québec and Genome Canada grant competition II) developed the algorithm for the data analysis. M. Toussaint is a recipient of a CRSNG fellowship. The majority of this work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to A.C.

6. References

- [1] J.H. Hoeijmakers, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature* 411 (2001) 366-374.
- [2] B.E. Henderson, R.K. Ross and M.C. Pike, Toward the primary prevention of cancer, *Science* 254 (1991) 1131-1138.
- [3] G. Evan and T. Littlewood, A matter of life and cell death, *Science* 281 (1998) 1317-1322.
- [4] S.E. Morgan and M.B. Kastan, p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer, *Adv Cancer Res* 71 (1997) 1-25.
- [5] F. Foury, Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast, *Gene* 195 (1997) 1-10.
- [6] A. Baudin, O. Ozier-Kalogeropoulos, A. Denouel, F. Lacroute and C. Cullin, A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res* 21 (1993) 3329-3330.
- [7] A. Wach, A. Brachat, R. Pohlmann and P. Philippsen, New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 10 (1994) 1793-1808.
- [8] E.A. Winzler, D.D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J.D. Boeke, H. Bussey, A.M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S.W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S.H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J.H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D.J. Lockhart, A. Luca-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J.L.

- Revuelta, L. Riles, C.J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R.K. Storms, S. Veronneau, M. Voet, G. Volckaert, T.R. Ward, R. Wysocki, G.S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston and R.W. Davis, Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis, *Science* 285 (1999) 901-906.
- [9] K.J. Rieger, M. El-Alama, G. Stein, C. Bradshaw, P.P. Slonimski and K. Maundrell, Chemotyping of yeast mutants using robotics, *Yeast* 15 (1999) 973-986.
- [10] K.J. Rieger, A. Kaniak, J.Y. Coppee, G. Aljinovic, A. Baudin-Baillieu, G. Orlowska, R. Gromadka, O. Groudinsky, J.P. Di Rago and P.P. Slonimski, Large-scale phenotypic analysis--the pilot project on yeast chromosome III, *Yeast* 13 (1997) 1547-1562.
- [11] P. Ross-Macdonald, P.S. Coelho, T. Roemer, S. Agarwal, A. Kumar, R. Jansen, K.H. Cheung, A. Sheehan, D. Symoniatis, L. Umansky, M. Heidtman, F.K. Nelson, H. Iwasaki, K. Hager, M. Gerstein, P. Miller, G.S. Roeder and M. Snyder, Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption, *Nature* 402 (1999) 413-418.
- [12] J. Warringer and A. Blomberg, Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 20 (2003) 53-67.
- [13] B. Singer and D. Grunberger, Molecular biology of mutagens and carcinogens, in, Springer; 1 edition, NY, 1983, pp. 55-78.
- [14] R.O. Pieper, DNA Damage and Repair: DNA Repair in Higher Eukaryotes, in: M.F. Hoekstra and J.A. Nickoloff (Eds.), Humana Press, Totowa, NJ, 1998, pp. 199-222.
- [15] S. Li and M.J. Smerdon, Nucleosome structure and repair of N-methylpurines in the GAL1-10 genes of *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 277 (2002) 44651-44659.

- [16] C. Lundin, M. North, K. Erixon, K. Walters, D. Jenssen, A.S. Goldman and T. Helleday, Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks, *Nucleic Acids Res* 33 (2005) 3799-3811.
- [17] T. Lindahl and R.D. Wood, Quality control by DNA repair, *Science* 286 (1999) 1897-1905.
- [18] M. Guillet and S. Boiteux, Origin of endogenous DNA abasic sites in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* 23 (2003) 8386-8394.
- [19] B.O. Krogh and L.S. Symington, Recombination proteins in yeast, *Annu Rev Genet* (2004) 233-271.
- [20] L.F. Povirk, DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes, *Mutat Res* 355 (1996) 71-89.
- [21] D. Ramotar and H. Wang, Protective mechanisms against the antitumor agent bleomycin: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr Genet* 43 (2003) 213-224.
- [22] J. Chen and J. Stubbe, Bleomycins: towards better therapeutics, *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 102-112.
- [23] J. Chen and J. Stubbe, Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues, *Curr Opin Chem Biol* 8 (2004) 175-181.
- [24] F. Paques and J.E. Haber, Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol Mol Biol Rev* 63 (1999) 349-404.
- [25] D.T. Beranek, Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, *Mutat Res* 231 (1990) 11-30.
- [26] R.H. Schiestl, P. Reynolds, S. Prakash and L. Prakash, Cloning and sequence analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD9 gene and further evidence that its product

is required for cell cycle arrest induced by DNA damage, *Mol Cell Biol* 9 (1989) 1882-1896.

[27] V.W. Burns, X-ray-induced division delay of individual yeast cells, *Radiat Res* 4 (1956) 394-412.

[28] G. Brunborg and D.H. Williamson, The relevance of the nuclear division cycle to radiosensitivity in yeast, *Mol Gen Genet* 162 (1978) 277-286.

[29] K.A. Nyberg, R.J. Michelson, C.W. Putnam and T.A. Weinert, Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints, *Annu Rev Genet* 36 (2002) 617-656.

[30] J. Cadet, C. Anselmino, T. Douki and L. Voituriez, Photochemistry of nucleic acids in cells, *J Photochem Photobiol B* 15 (1992) 277-298.

[31] J. Cadet, E. Sage and T. Douki, Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA, *Mutat Res* 571 (2005) 3-17.

[32] E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, R.D. Wood, R.A. Schultz and T. Ellenberger, DNA repair and mutagenesis, in, ASM Press; 2nd edition, Washington, DC, 2005.

[33] S. Prakash and L. Prakash, Nucleotide excision repair in yeast, *Mutat Res* 451 (2000) 13-24.

[34] C.B. Brachmann, A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter and J.D. Boeke, Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications, *Yeast* 14 (1998) 115-132.

- [35] M.H. Zwietering, I. Jongenburger, F.M. Rombouts and K. van 't Riet, Modeling of the bacterial growth curve, *Applied environmental microbiology* 56 (1990) 1875-1881.
- [36] S. Lopez, M. Prieto, J. Dijkstra, M.S. Dhanoa and J. France, Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth, *Int J Food Microbiol* 96 (2004) 289-300.
- [37] G. Giaever, A.M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A.P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K.D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D.J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J.H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D.F. Jaramillo, D.E. Kelly, S.L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D.C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S.L. Ooi, J.L. Revuelta, C.J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D.D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R.K. Storms, J.N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C.Y. Wang, T.R. Ward, J. Wilhelmy, E.A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J.D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R.W. Davis and M. Johnston, Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome, *Nature* 418 (2002) 387-391.
- [38] R.A. Verhage, A.J. van Gool, N. de Groot, J.H. Hoeijmakers, P. van de Putte and J. Brouwer, Double mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with alterations in global genome and transcription-coupled repair, *Mol Cell Biol* 16 (1996) 496-502.
- [39] A. Conconi, P. Jager-Vottero, X. Zhang, B.C. Beard and M.J. Smerdon, Mitotic viability and metabolic competence in UV-irradiated yeast cells, *Mutat Res* 459 (2000) 55-64.

- [40] A. Conconi, V.A. Bespalov and M.J. Smerdon, Transcription-coupled repair in RNA polymerase I-transcribed genes of yeast, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 649-654.
- [41] R. Waters and M.J. Smerdon, Preface, *DNA Repair (Amst)* 4 (2005) 853-854.
- [42] Y. Teng, Y. Yu and R. Waters, The *Saccharomyces cerevisiae* histone acetyltransferase Gcn5 has a role in the photoreactivation and nucleotide excision repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in the MFA2 gene, *J Mol Biol* 316 (2002) 489-499.
- [43] Y. Yu, Y. Teng, H. Liu, S.H. Reed and R. Waters, UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 8650-8655.

3 – Differential participation of homologous recombination and nucleotide excision repair in yeast survival to ultraviolet light radiation

3.1 – Avant-propos de l'article 2

Ce deuxième article, dont Raymund Wellinger et Antonio Conconi sont co-auteurs, présente la caractérisation du phénotype de résistance des mutants *sir2*Δ par rapport aux cellules de type sauvage après une irradiation aux rayons UV. En tant que premier auteur de cet article, et unique auteur étudiant, j'ai été responsable de développer les concepts qui ont permis d'expliquer ce phénotype. Pour ce faire, j'ai d'abord approfondi la littérature sur le gène *SIR2*, mais aussi sur tous les gènes de la famille des *SIR*, à savoir les gènes *SIR1*, *SIR2*, *SIR3* et *SIR4*. Rapidement, j'ai considéré important de tester l'implication du phénomène de pseudo-diploïdie présent dans les mutants *sir*Δ, qui pourrait expliquer ce phénotype, ce qui s'est avéré être le cas. Guidé par les discussions avec le Dr Antonio Conconi et le Dr Raymund Wellinger, en plus des réunions de laboratoire où nous pouvions interagir scientifiquement plus directement entre les étudiants, j'ai élaboré et exécuté toutes les expériences de cet article. Ce manuscrit présente une analyse importante de l'implication de la recombinaison homologue et de la NER dans la phase G2/M du cycle cellulaire, et confirme une tendance bien lancée dans la littérature voulant que les mécanismes de réparation interagissent fréquemment pour assurer une survie maximale des cellules lorsque l'ADN est endommagé. De plus, cet article présente, à ma connaissance, la première analyse comparative quantitative (par le temps de latence de la croissance de mutants) de l'importance de la NER et de la

recombinaison homologue dans la survie des cellules irradiées aux rayons UV. L'article est présentement en révision dans la revue Mutation Research – Environmental mutagenesis and toxicology.

3.2 – Résumé de l'article

Étant donné les intérêts du laboratoire, la découverte du mutant *sir2* Δ montrant une résistance accrue aux rayons UV s'est avérée fort intéressante. La protéine Sir2p joue un rôle important, notamment dans la construction de l'hétérochromatine des télomères et du locus du type sexuel. Le gène *SIR2* fait partie d'une famille de gènes appelée SIR (*Silent Information Regulator*) qui contient quatre membres; *SIR1*, *SIR2*, *SIR3* et *SIR4*. Nous avons démontré que tous les mutants *sir* Δ récupèrent plus rapidement par rapport aux cellules de type sauvage après une irradiation aux rayons UV, et que l'effet de ploïdie dans ces mutants, produit par l'expression de tous les gènes du type sexuel à la suite de la perte des gènes *SIR*, était responsable de ce phénotype. De plus, nous avons montré que la recombinaison homologe serait responsable de la récupération plus rapide des mutants *sir* Δ après irradiation aux UV, puisque les doubles mutants *sir* Δ *rad52* Δ , *sir* Δ *rad54* Δ et *sir* Δ *rad57* Δ ne montrent pas une résistance par rapport aux simples mutants, *rad52* Δ , *rad54* Δ et *rad57* Δ , respectivement. De plus, nous avons démontré que les cellules synchronisées en phase G2/M du cycle cellulaire montrent aussi une récupération plus rapide par rapport à des cellules non synchronisées et des cellules synchronisées en phase G1 du cycle cellulaire, et que ce phénotype est dépendant de la recombinaison homologe. La réparation globale du génome (GG-NER) serait aussi impliquée dans la résistance des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire, démontrant une coopération entre la NER et la recombinaison homologe dans cette phase du cycle cellulaire, afin d'assurer une survie maximale des cellules. Finalement, nous avons procédé à une comparaison de la sensibilité des mutants de la NER par rapport à des mutants de la

recombinaison homologue, dans des cultures de cellules non synchronisées. Ceci nous a permis de caractériser quantitativement l'importance relative de la réparation par excision de nucléotide par rapport à la recombinaison homologue dans la survie des cellules après irradiation aux rayons UV.

3.3 - Differential participation of homologous recombination and nucleotide excision repair in yeast survival to ultraviolet light radiation

Martin Toussaint, Raymund J. Wellinger and Antonio Conconi*

Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada.

Abstract

AIMS: The purpose of this research was to assess the ultraviolet light (UV) phenotype of yeast *sirΔ* cells vs. WT cells, and to determine whether de-silenced chromatin or the intrinsic pseudoploidy of *sirΔ* mutants contributes to their response to UV. Additional aims were to study the participation of HR and NER in promoting UV survival during the cell cycle, and to define the extent of the co-participation for both repair pathways. **MAIN METHODS:** The sensitivity of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to UV light was determined using a method based on automatic measurements of optical densities of very small (100 μl) liquid cell cultures. **KEY FINDINGS:** We show that pseudodiploidy of *sirΔ* strains promotes resistance to UV irradiation and that HR is the main mechanism that is responsible for this phenotype. In addition, HR together with GG-NER renders cells in the G2-phase of the cell cycle more resistant to UV irradiation than cells in the G1-phase, which underscore the importance of HR when two copies of the chromosomes are present. Nevertheless, in asynchronously growing cells NER is the main repair pathway that responds to UV induced DNA damage. **SIGNIFICANCE:** This study provides detailed and quantitative information on the co-participation of HR and NER in UV survival of yeast cells.

Keywords: *Cell survival, Mating type, Homologous recombination, Nucleotide excision repair, Sir proteins, Pseudo-diploid, Ultraviolet light radiation*

Abbreviations: *CPD, cis-sin cyclobutane pyrimidine dimer; DSB, double strand break; FACS, Fluorescence-activated cell sorting; GG-NER, global genome NER; HR, homologous recombination; HM, cryptic mating-type; MAT, mating-type; NER, nucleotide excision repair; SIR, silent information regulator; TC-NER, transcription-coupled NER; UV, ultraviolet light*

1. Introduction

In living cells, DNA is prone to damage that can be induced endogenously by cellular metabolites, or exogenously by a plethora of chemical and physical environmental agents. If not repaired, DNA damage can lead to mutations, carcinogenesis or cell death [1,2]. Cells have developed complex DNA repair pathways that are specific for each class of DNA lesion, although extensive cross-talk between repair pathways can occur [3]. One type of harmful DNA lesions are DNA double strand breaks (DSB) that result from ionizing radiation [4] or can form during the process of DNA replication [5,6]. Homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ) are the main pathways that repair these lesions [7]. In *Saccharomyces cerevisiae*, HR is mediated by the products of genes from the *RAD52* epistasis group (*MRE11*, *XRS2*, *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59* and *RDH54/TID1*) [8]. DNA lesions that are repaired by HR are first processed by the 5' to 3' nucleolytic activities, which create a single-stranded DNA (ssDNA) tail that is bound by Rad51p. Then, recombination proceeds in three steps: strand invasion, whereby the invading 3' end is extended by DNA synthesis; branch migration, followed by second end capture; and double Holliday junction formation that are resolved with or without crossovers [8].

Another important type of DNA lesion is the *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) that is generated by ultraviolet light (UV). In general, this lesion is removed by nucleotide excision repair (NER). NER proceeds in five steps: recognition of the damage, incision of the DNA strand on both sides of the lesion, DNA unwinding and excision of a ~30 nucleotides long DNA fragment containing the lesion with the formation of a ssDNA

gap, filling of the gap by DNA synthesis, and DNA ligation [1,9]. In yeast, genes involved in NER can be classified into two groups: mutations in group-I (*RAD1*, 2, 3, 4, 10, 14 and 25) confer a high degree of sensitivity to UV, whereas mutations in group-II (*RAD7*, 16, 23 and *MMS19*) confer a moderate degree of sensitivity [9]. In addition, CPDs are rapidly removed from the transcribed strand (TS) of actively transcribed RNA polymerase II and I genes, a process that is referred to as transcription-coupled NER (TC-NER) [10-15]. Rad26p and Rad34p participate in TC-NER driven by RNA polymerase II and I, respectively [16-18]. The non-transcribed DNA strands are repaired by global genome NER (GG-NER), which requires the Rad7p-Rad16p and Abf1 complexes [19].

DNA repair processes are not mutually exclusive. For instance, cross-talk occurs between HR and NER [20,21], and budding yeast cells with defective HR (e.g., *rad52Δ*) are more sensitive to UV irradiation [22,23]. Furthermore, the heterodimer Rad1p/Rad10p takes part in both NER and HR [24] and, in at least some situations, HR repairs CPDs that are present on the TS of active genes [20]. On the other hand, NER and the stalling of replication forks at CPDs create DNA nicks and single-stranded gaps, which promote recombination in mitotic cells [25-29]. Consequently, UV irradiation can induce DNA recombination [25,30-34]. However, to what extent HR contributes, together with NER, to cell survival after UV irradiation is not clear.

DNA repair is affected by the structure of chromatin [35-38], whereby arrays of nucleosomes inhibit the recognition of the damage and/or its removal [39,40]. In yeast, transcriptionally silenced chromatin is functionally analogous to heterochromatin in higher eukaryotes. It forms at some DNA regions, including the cryptic mating-type loci

(*HM loci*) and telomeres [41-44]. The establishment of these domains is dependent on the histone de-acetylase Sir2p and on structural proteins such as Sir3p and Sir4p. At the *HM loci*, the recruitment of the structural Sir proteins requires Sir1p, whereas at telomeres Rap1p and Ku70/Ku80, but not Sir1p, are required [45-47]. It is thought that the presence of the Sir-complex represses transcription by compacting chromatin [48,49]. Hence, deletion of *SIR2*, *SIR3* or *SIR4* abolishes both *HM* repression [50] and telomeric silencing [42]. Loss of *HM* silencing results in the expression of the sexual mating type “a” and “ α ” transcription-regulators genes, which reside at the *HML* and *HMR* loci, respectively. Thus, in addition to the active *MAT* locus, haploid *sir* Δ mutant strains express both *HMRa* and *HMLa* genes. Since they display properties of *MATa/MATa* diploids, haploid *sir* Δ mutants are defined as pseudo-diploid cells [50,51].

Similar to the process of transcription, silenced chromatin inhibits DNA repair. For example, NER removes CPDs more slowly from the silenced *HML* locus than from the active *MATa* locus, and this preferential repair is abolished in *sir3* Δ mutants [52,53]. Moreover, deletion of *SIR2* increases NER efficiency in the *HML* locus [37]. Analogously, the efficiency of repair of CPDs was examined in the *URA3* gene that was engineered near the right telomere end of chromosome V and, therefore, it is subject to telomeric transcriptional silencing. It was found that NER in the *URA3* gene operates more efficiently in *sir3* Δ cells than in the WT, conversely over expression of Sir3p reduces the efficiency of DNA repair even further [54]. Therefore, *sir* Δ cells could be more resistant to UV irradiation, although this condition has not been thoroughly tested.

In this study we analyzed whether *sir2*Δ mutants are more resistant to UV irradiation and, if so, whether this phenotype results from the activity of HR in pseudo-diploid cells. In addition, the impact of HR and NER in cell recovery from UV irradiation was investigated in G2/M-synchronized cells, and the co-participation of HR and NER was followed in different phases of the cell cycle. Finally, the contribution of HR vs. NER to cell survival after UV irradiation was determined in exponentially (asynchronous) growing cells.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains

All strains are listed in table 1. Additional information for the BY4741-related strains is available in the *Saccharomyces* Genome Deletion Project web site [http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html]. Diploid MTO5 (*sir2*Δ::*HIS3*/*sir2*Δ::*KanMX4*) was constructed by mating for 6h at 30°C YDL042C (*Mata sir2*Δ::*KanMX4 his3*Δ1 *leu2*Δ0 *met15*Δ0 *ura3*Δ0) [55] with MTO4 (*Mata sir2*Δ::*HIS3 ade2*Δ::*hisG his3*Δ200 *met15*Δ0 *trp1*Δ63 *ura3*Δ0), both containing pDR589 (*SIR2* inserted in pRS426, kindly provided by Dr Rivier). Selection for *sir2*Δ/*sir2*Δ diploid cells without pDR589 was made on synthetic medium YC-LEU-TRP containing 1 g/L of 5-FOA (5-fluoroorotic acid; Bioshop cat# FOA555). MTO4 was constructed by one step PCR deletion strategy [56] using BY4737 (*Mata ade2*Δ::*hisG his3*Δ200

met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0) [56], with *sir2Δ*-fwd and *sir2Δ*-rev primers (table 2) and 1 ng of pRS303 [57]. The diploid MTO6 (homozygous for all *SIR* loci) was constructed by mating BY4741 (*Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) [56] with BY4737 (*Mata ade2Δ::hisG his3Δ200 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0*) (Brachmann yeast vol 14 p115), and selected on synthetic medium YC-LEU-TRP. The strains MTO131 to MTO135 were constructed by one step PCR deletion strategy [56] with *rad50Δ*-F and *rad50Δ*-R primers (table 2) and 1 ng of pRS305 [57]. The strains MTO24 to MTO28 were constructed using *rad52Δ*-fwd and *rad52Δ*-rev primers (table 2) with 1 ng of pRS305 [57], and MTO44 to MTO48 were constructed with *rad54Δ*-fwd and *rad54Δ*-rev primers (table 2) and 1 ng of pRS305 [57]. Correct insertion of PCR fragments into the genome was confirmed by southern blot analysis of total genomic DNA derived from the respective strains.

Table 1 Strains

Name	Genotype	References
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	[56]
YKR101W	Same as BY4741 <i>sir1Δ::KanMX4</i>	[55]
YDL042C	Same as BY4741 <i>sir2Δ::KanMX4</i>	[55]
YLR442C	Same as BY4741 <i>sir3Δ::KanMX4</i>	[55]
YDR227W	Same as BY4741 <i>sir4Δ::KanMX4</i>	[55]
YJR052W	Same as BY4741 <i>rad7Δ::KanMX4</i>	[55]
JRY2334	Isogenic to W303-1a; Mata <i>ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	[51]
JRY4563	Same as JRY2334 <i>sir2Δ::TRP1</i>	[51]
JRY3289	Same as JRY2334 <i>sir3Δ::TRP1</i>	[51]
JRY4580	Same as JRY2334 <i>sir4Δ::TRP1</i>	[51]
JRY3658	Same as JRY2334 <i>hmla^Δp mata^Δp hmra^Δp</i>	[51]
JRY6348	Same as JRY2334 <i>hmla^Δp mata^Δp hmra^Δp sir2Δ::TRP1</i>	[51]
JRY3606	Same as JRY2334 <i>hmla^Δp mata^Δp hmra^Δp sir3Δ::TRP1</i>	[51]
JRY6349	Same as JRY2334 <i>hmla^Δp mata^Δp hmra^Δp sir4Δ::TRP1</i>	[51]
JRY5384	Mata/Matα	[51]
JRY6328	Mata ^Δ p/Matα	[51]
MTO5	<i>sir2Δ::KanMX4/sir2Δ::HIS3</i> (YDL042C X MTO4)	This study
MTO6	Mata/Matα (BY4741 X BY4737)	This study
MTO64	Same as BY4741 <i>rad26Δ::LEU2</i>	This study
MTO65	Same as YKR101W <i>ra26Δ::LEU2</i>	This study
MTO66	Same as YDL042C <i>rad26Δ::LEU2</i>	This study
MTO67	Same as YLR442C <i>rad26Δ::LEU2</i>	This study

MTO68	Same as YDR227W <i>rad26Δ::LEU2</i>	This study
MTO131	Same as BY4741 <i>rad50Δ::LEU2</i>	This study
MTO133	Same as YDL042C <i>rad50Δ::LEU2</i>	This study
MTO134	Same as YLR442C <i>rad50Δ::LEU2</i>	This study
MTO135	Same as YDR227W <i>rad50Δ::LEU2</i>	This study
MTO24	Same as BY4741 <i>rad52Δ::LEU2</i>	[60]
MTO25	Same as YKR101W <i>rad52Δ::LEU2</i>	This study
MTO26	Same as YDL042C <i>rad52Δ::LEU2</i>	This study
MTO27	Same as YLR442C <i>rad52Δ::LEU2</i>	This study
MTO28	Same as YDR227W <i>rad52Δ::LEU2</i>	This study
MTO44	Same as BY4741 <i>rad54Δ::LEU2</i>	This study
MTO45	Same as YKR101W <i>rad54Δ::LEU2</i>	This study
MTO46	Same as YDL042C <i>rad54Δ::LEU2</i>	This study
MTO47	Same as YLR442C <i>rad54Δ::LEU2</i>	This study
MTO48	Same as YDR227W <i>rad54Δ::LEU2</i>	This study
W3749-1A	Isogenic to W303; Mata <i>can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 bar1Δ::LEU2</i>	[69]
YJR052W	Same as BY4741 <i>rad7Δ::KanMX4</i>	[55]
YBR114W	Same as BY4741 <i>rad16Δ::KanMX4</i>	[55]
YJR035W	Same as BY4741 <i>rad26Δ::KanMX4</i>	[55]
YDR314C	Same as BY4741 <i>rad34Δ::KanMX4</i>	[55]
YMR224C	Same as BY4741 <i>mre11Δ::KanMX4</i>	[55]
YNL250W	Same as BY4741 <i>rad50Δ::KanMX4</i>	[55]
YDR369C	Same as BY4741 <i>xrs2Δ::KanMX4</i>	[55]
YER095W	Same as BY4741 <i>rad51Δ::KanMX4</i>	[55]
YGL163C	Same as BY4741 <i>rad54Δ::KanMX4</i>	[55]
YDR076W	Same as BY4741 <i>rad55Δ::KanMX4</i>	[55]

Table 2 Oligos

Name	Sequence
sir2Δ-fwd	5'-AGACACATTCAAACCATTTTTCCCTCATCGGCACATTAAAGAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCAC-3'
sir2Δ-rev	5'-AATGTCATCACAGTACCCCAAAAGAGATAAATCAAATCTGCTGTGCGGTATTTACACCCG-3'
rad50D-f	5'-GCAGACAATTGACGCAAGTTGTACCTGCTCAGATCCGATAAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCAC-3'
rad50D-r	5'-CCTTGTGTTTCGCGAAGGCAAGCCCTTGGTTATAAATAGGCTGTGCGGTATTTACACCCG-3'
rad52Δ-fwd	5'-GGAGGTTGCCAAGAAGCTGCTGAAGGTTCTGGTGGCTTTGGAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCAC-3'
rad52Δ-rev	5'-GTTTCGGCCAGGAAGCGTTTCAAGTAGGCTTTCGCTGCATGCTGTGCGGTATTTACACCCG-3'
rad54Δ-fwd	5'-GAGCAGCAACTTTTCTCTTTCTTCACTAAAGCTGCTACGAAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCAC-3'
rad54Δ-rev	5'-CCATGCCCATCATTTAAATAAATATGTAATGACCCCGCTGTGCGGTATTTACACCCG-3'

2.2. Media, growth conditions and UV irradiation

Yeast were grown exponentially ($\sim 0.7 \times 10^7$ to 10^7 cells/ml) in yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) at 26°C and under continuous rotation. After centrifugation, cells were

re-suspended in sterile water to 0.8×10^7 cells/ml and UV irradiated (see below). For each strain, three wells of a 96-well non-coated polystyrene microplates (Corning incorporated) containing 95 μ l of fresh YEPD were inoculated with 5 μ l of irradiated, or mock treated, yeast cultures (corresponding to 4×10^4 cells), and cell growth was monitored with a PowerWave micoplate scanning spectrophotometer (Bio-Tek). The optical density was automatically recorded using KC4 microplate data analysis software (Bio-Tek), and the software was programmed with the following settings: the optical density was measured at 660 nm, incubation was kept at 30°C, $\pm 0.1^\circ\text{C}$, the microplates were subjected to continuous shaking at intensity 2, during 595 seconds. Readings were done every ten minutes during a 48 hour period.

For UV irradiation, yeast cells, 300 μ l of 0.8×10^7 cells/ml in sterile water, were placed on a glass plate and UV irradiated (primary 254 nm) with 50, 80, 100 and 150 J/m^2 , as measured with a UVX radiometer (Ultra-Violet Products, Upland, US). To study repair of UVC induced DNA lesions in yeast, doses in the range of 100 to 200 J/m^2 are often used (e.g., [15,58]). For the colony-formation assays described in figure 1, 5 μ l of ten fold serial dilutions (0.8×10^7 , 0.8×10^6 , 0.8×10^5 , 0.8×10^4 and 0.8×10^3 cells/ml), from the same mock treated or UV irradiated cells used for the growth curve assay, were spotted on YEPD plates. The plates were incubated in the dark at 30°C for 48 h.

2.3. Data collection and analysis of growth curves

Analysis of cell recovery after UV irradiation is described in detail in previous studies [59,60]. Briefly, the curves obtained were analyzed by an algorithm to obtain two

growth parameters: the lag time (λ), which represents the time required for a population of cells to reach its maximal growth rate, and the recovery time (RT), which corresponds to the time needed to recover from UV irradiation. RT is calculated by subtracting the λ at 0 J/m² from the λ at 150 J/m² ($RT_{150} = \lambda_{150} - \lambda_0$).

2.4. Cell synchronization and FACS analyses

Cells were grown exponentially ($\sim 0.7 \times 10^7$ to 10^7 cells/ml) in YEPD at 30°C under continuous rotation, collected and re-suspended in 1.5 ml fresh YEPD at 0.4×10^7 cells/ml (asynchronised cultures) or in 1.5 ml fresh YEPD with 1 μ g/ml of alpha factor (sigma cat# T6901) (G1 synchronized cultures) or in 1.5 ml fresh YEPD with 10 μ g/ml of nocodazol (sigma cat# M1404) (G2 synchronised cultures). Thereafter, cultures were incubated at 30 °C for 2 h under continuous rotation, collected by centrifugation and re-suspended in 1.5 ml sterile water. The washing step was repeated four times and 300 μ l of cell suspension were irradiated as described in section 2.2. In parallel, 800 μ l of washed cells were prepared for FACScan as following: collected, re-suspend in 1 ml ethanol 70 % (v/v), and incubated for 1 h at room temperature. Cells were harvested, washed in 1 ml PBS (phosphate buffer saline; 37 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Sodium Phosphate dibasic, 2 mM Potassium Phosphate monobasic, pH of 7.4) and incubated for 1h at 37 °C in the dark in 1 ml staining solution [0.5 mg RNase A (Roche applied science cat# 1 119 915) and 5 mg propidium iodide (Sigma cat# P4170) per ml PBS], followed by gentle sonication (2 sec, at setting 1 on a Visonic 50, Virtis) to disrupt cell clumps. Cell

acquisition was made with a Becton-Dickinson FACScan cytometer and the data analyzed with the CellQuest software (Becton-Dickinson).

3. Results and discussion

3.1 *Yeast sirΔ haploid strains recover faster than the WT from UV irradiation*

Wild type (WT), *sir1Δ*, *sir2Δ*, *sir3Δ*, *sir4Δ* and *rad7Δ* (here used as control) cells were irradiated with 150 J/m² of UV light. Their sensitivities to UV irradiation were compared by spotting serial dilutions of yeast suspensions on solid medium, or by using the growth curve assay of yeast grown in liquid medium [59,60]. Both assays show that all yeast strains replicate similarly under normal growth conditions (Figs. 1A and 1B, upper panels), and that *rad7Δ* is highly sensitive to UV irradiation at 150 J/m² (Figs. 1A and 1B, lower panels). After UV irradiation, the spot test does not show any significant differences in colony formation between *sirΔ* and WT cells (Fig. 1B, lower panel). Conversely, the growth curve assay clearly shows that *sirΔ* mutants recover faster than WT from UV irradiation. Compared to *sirΔ* mutants, the higher UV sensitivity of WT is revealed by the longer time needed to reach OD₆₆₀ ~0.4 (Fig. 1A, lower panel). These results show that the growth curve assay can reveal changes in UV sensitivity when yeast strains are only weakly affected in DNA repair proficiency. Thus, the growth curve assay was used in the experiments that follow. The OD curves (Fig. 1A) were analyzed by an algorithm to calculate the lag time (λ) that represents the time required for a population of cells to reach its maximal growth rate, and the recovery time (RT) that corresponds to the time needed to recover from UV irradiation [59,60]. RT is calculated by subtracting the λ at 0 J/m² from the λ at 150 J/m² ($RT_{150} = \lambda_{150} - \lambda_0$). A comparison of the RT_{150} values for

the *sir* Δ mutants with those obtained for WT clearly shows that the *sir* Δ strains recover significantly faster than the WT (Fig. 1C).

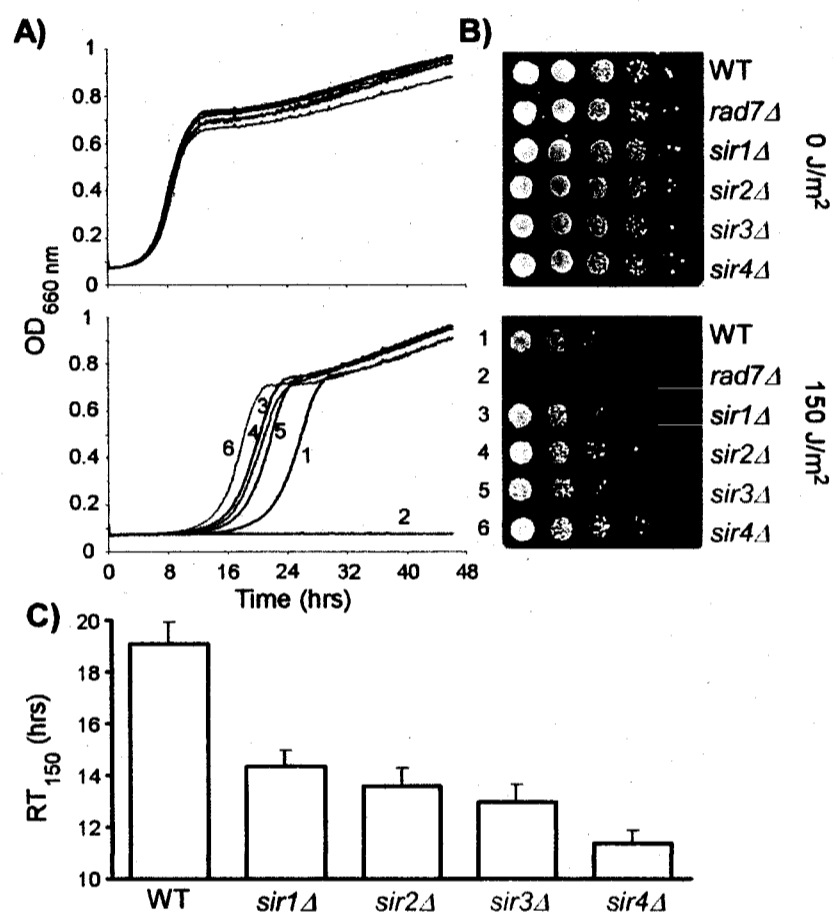


Fig. 1. Exposure of WT, *rad7* Δ , *sir1* Δ , *sir2* Δ , *sir3* Δ , and *sir4* Δ cells to UV irradiation. (A) Analysis of cell concentration by optical density (OD₆₆₀) measurements. Yeast were grown exponentially and mock treated (0 J/m², upper panel) or UV irradiated (150 J/m², lower panel), and 4×10^4 cells were deposited in triplicate in 96-well plates. Cell densities were measured every 10 min for 48 h. Curves 1, 2, 3, 4, 5 and 6 are WT, *rad7* Δ , *sir1* Δ , *sir2* Δ , *sir3* Δ , or *sir4* Δ cells, respectively. (B) Spot test assay. Ten-fold serial dilutions of the same cultures were spotted on YEPD plates and incubated in the dark at 30°C for 48 h. (C) The lag times (λ) in hours obtained from 24 independent growth curve experiments were calculated and used to generate the recovery time ($RT_{150} = \lambda_{150} - \lambda_0$). Values represent the mean \pm S.E., $p = 0,0003$ for *sir1* Δ and $p < 0,0001$ for *sir2* Δ , *sir3* Δ and *sir4* Δ .

3.2 Fast recovery of diploid and pseudo-diploid yeast cells after UV irradiation

Haploid *sir* Δ mutants present characteristics of a/ α diploid yeast and are described as pseudo-diploid cells [50,51]. It was shown that diploid and pseudo-diploid cells present increased resistance to γ -ray radiation and radiomimetic drugs [61-63]. Whether the UV resistance phenotype of *sir* Δ cells reported here (Fig. 1) results from pseudo-diploidy or from increased DNA repair activity in de-silenced chromatin is not known. In order to distinguish between these possibilities, we used a strain in which a deletion of *SIR*-genes does not induce pseudo-diploidy. In this strain, all genes for mating-type specificity (*HML*, *MAT*, *HMR*) are inactivated by promoter deletions (*hmla* ^{Δ} *p* *mata* ^{Δ} *p* *hmra* ^{Δ} *p*) [51]. Therefore, the *hmla* ^{Δ} *p* *mata* ^{Δ} *p* *hmra* ^{Δ} *p* cells behave like a-mating haploid cells even when the *SIR* genes are deleted [51].

Cells recovery from UV irradiation was analyzed as described in the previous section. The results show that all strains grow at a similar rate (Fig. 2A, 0J/m²), and that *sir* Δ strains in this genetic background recover faster than the WT cells from UV irradiation at 150 J/m² (data not shown). Conversely, the times of recovery for the *hmla* ^{Δ} *p* *mata* ^{Δ} *p* *hmra* ^{Δ} *p* *SIR*⁺ strain and all *hmla* ^{Δ} *p* *mata* ^{Δ} *p* *hmra* ^{Δ} *p* *sir* Δ strains are very similar (Fig. 2A, 150 J/m²; compare 1 with 2, 3 and 4). Thereafter, we followed recovery from UV irradiation of two *SIR*⁺ diploid strains: an a/ α diploid (WT) and an a⁻/ α diploid (*mata* ^{Δ} *p*/*MAT* α) in which only the α information is expressed. The a⁻/ α strain, albeit being diploid and having two copies of the genome, it behaves like α -mating haploid and is typified as pseudo-haploid. The data show that both strains grow at similar rates before irradiation (Fig. 2B, 0 J/m²). After irradiation with 150 J/m² of UV light, the a/ α diploid

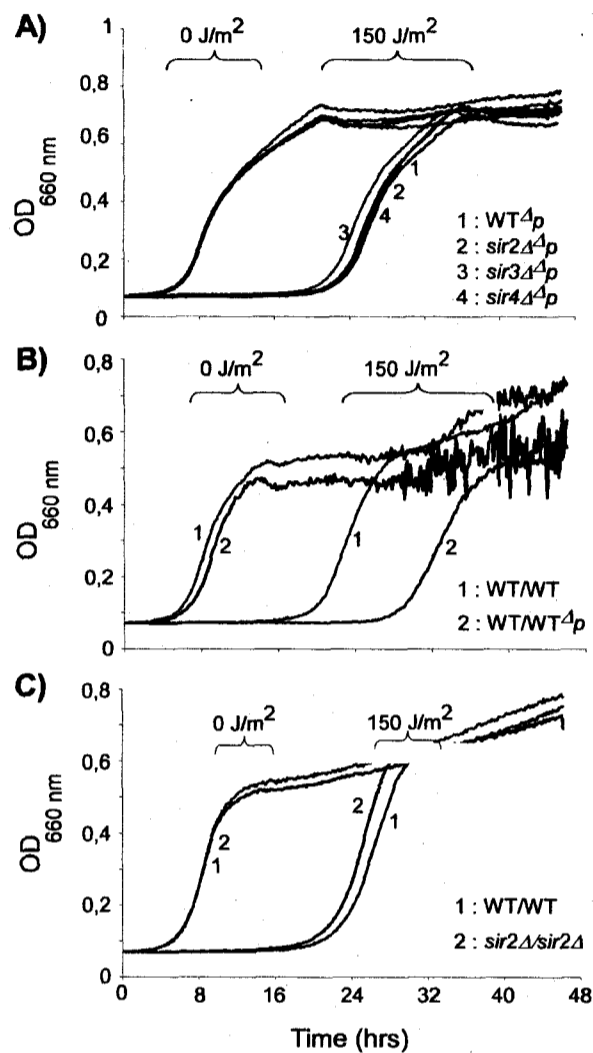


Fig. 2. Exposure of haploid, pseudo-diploid and diploid cells to UV irradiation. Yeast were grown exponentially, mock treated (0 J/m²) or UV irradiated (150 J/m²). Analyses of cell concentration by optical density (OD₆₆₀) were done as in figure 1A. (A) Analyses of UV recovery for WT, *sir2*Δ, *sir3*Δ and *sir4*Δ in which all mating type genes were inactivated by promoter deletion (*hmla*^{Δp}, *mata*^{Δp}, *hmra*^{Δp}) (curves 1, 2, 3 and 4, respectively). (B) Analyses of UV recovery for an a/a diploid strain (WT/WT; curves 1) and a/α diploid strain (WT^{4p}/WT: *hmla*^{Δp}, *mata*^{Δp}, *hmra*^{Δp}/HMLa, MATa, HMRA; curves 2). (C) Analyses of UV recovery for WT diploid cells (WT/WT; curves 1) and homozygous *sir2*Δ diploid cells (*sir2*Δ/*sir2*Δ; curves 2).

cells recover faster than the a/α pseudo-haploid cells (Fig. 2B, compare curves 1 and 2).

These results support the notion that changes in sexual mating type, rather than changes in repair of DNA in silent chromatin regions, control the recovery speed of *sir*Δ mutants

after UV irradiation. Finally, UV sensitivity was followed for the diploids WT (*SIR2/SIR2*) and the homozygous *sir2* Δ cells (*sir2* Δ /*sir2* Δ). Both diploid strains grow at a similar rate (Fig. 2C, 0 J/m²) and show similar recovery lag-times after UV irradiation (Fig. 2C, 150 J/m²). Thus, diploid cells lacking the *SIR2* gene are not affected in the recuperation from UV irradiation. These data show that the absence of *SIR*-genes, and therefore of silenced chromatin domains, is not the predominant cause for fast recovery from UV irradiation. Consequently, the pseudo-diploidy phenotype of haploid *sir* Δ mutants promotes this fast recovery.

3.3 Fast recovery of *sir* Δ haploid cells (pseudo-diploids) after UV irradiation depends on the HR *RAD50*, *RAD52* and *RAD54* genes, but not on the NER *RAD26* gene.

To further investigate the relative fast recovery of *sir* Δ pseudo-diploid cells from UV irradiation, we ascertained the contribution of genes involved in HR and NER pathways. In haploid cells, HR uses DNA sequences on sister chromatids (in late S and G2/M phase of the cell cycle) to ensure faultless repair of DSBs [8]. UV irradiations and measurements of cell recovery for WT, *rad50* Δ , *rad52* Δ , *rad54* Δ , *sir* Δ , and their respective double mutants were performed as described in the previous sections. As expected from the results shown in figure 1, *sir* Δ strains recover faster than WT cells: the RT₁₅₀ for *sir1* Δ , *sir2* Δ and *sir3* Δ being about 14 h, the RT₁₅₀ for *sir4* Δ being about 12 h, and the RT₁₅₀ for the WT being about 19 h (Fig. 3). Compared to WT, the *rad50* Δ , *rad52* Δ and *rad54* Δ strains are considerably more sensitive to UV irradiation (Fig. 3; compare filled bars), underscoring the implication of HR in cell recovery from UV

irradiation. On average, these *radΔ* strains need an additional 6.5 hours to recover from the insult. Moreover, *rad50Δ*, *rad52Δ* and *rad54Δ* show similar recovery times and, therefore, are about equally sensitive to UV irradiation. The *sir1Δ*, *sir3Δ* and *sir4Δ* double mutants with *rad50Δ*, *rad52Δ* and *rad54Δ* have similar recovery times as the single *rad50Δ*, *rad52Δ* and *rad54Δ* mutants; the *sir3Δrad50Δ* being somewhat more sensitive. These results imply that HR participates in the accelerated recovery of pseudo-diploid cells from UV induced DNA damage. The Sir2p could have additional functions, since the *sir2Δ radΔ* double mutants are generally more sensitive than the corresponding *radΔ* single mutants. Given that Sir2p belongs to a large family of NAD-dependent enzymes, which influences the expression of a number of RNA polymerase II transcripts [64], Sir2p may have broader effects on cell metabolism. Therefore, we cannot exclude the possibility that Sir2p affects UV sensitivity in complex and indirect ways.

To test if NER participates in the fast recovery of pseudo-diploid cells from UV induced DNA damage, we repeated the same experiments with *sirΔ rad26Δ* double mutants. [Note: in previous experiments we have shown that fast recovery after UV irradiation of *sir2Δ* cells compared to WT can be measured only at doses of 150 J/m² and above (60). These same results were obtained with *sir1*, *3* and *4Δ* strains (data not shown). At these doses yeast that are deleted for one of the group-I or II NER genes are highly sensitive to UV irradiation and do not grow (Fig. 6D). Thus, only the *rad26Δ* strain could be used to overcome this obstacle, although the implication of only one of the two NER sub-pathways is tested]. UV irradiations with a dose of 150 J/m² and measurements of cell recovery for WT, *rad26Δ*, and *sirΔ rad26Δ* double mutants were done as described above. In the *rad26Δ* strain TC-NER is impaired and, as expected, the

rad26Δ strain is more sensitive to UV irradiation than the WT (Fig. 3; compare filled bars), that is; it needs an additional ~10 hours to recover from the insult. The *sir1Δ*, *sir2Δ*, *sir3Δ* and *sir4Δ* double mutants with *rad26Δ* recover faster than the *rad26Δ* single mutant. This result implies that TC-NER does not participate in the accelerated recovery of pseudo-diploid cells from UV induced DNA damage.

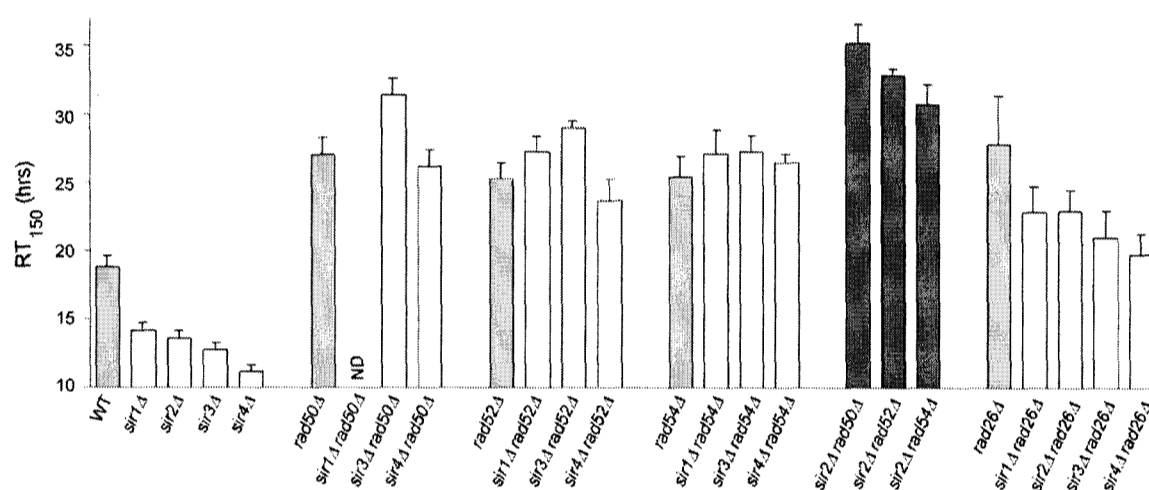


Fig. 3. Exposure of WT, *sir1Δ*, *sir2Δ*, *sir3Δ*, *sir4Δ*, *rad50Δ*, *rad52Δ*, *rad54Δ*, *rad26Δ* and *sirΔ radΔ* double mutants to UV irradiation. Yeast strains were grown and UV irradiated as described in materials and methods. Analyses of cells recovery were done as in figure 1A and the RT₁₅₀ values were calculated as in figure 1C. Values represent the mean \pm 1 S.E. of three independent experiments. ND: not determined.

3.4 Haploid cells in G2-phase recover faster than cells in G1-phase from UV irradiation

Since in haploid cells, HR takes place during the S/G2/M phases of the cell cycle [8], whereas NER is active throughout the cell cycle [65-68], we investigated the recovery of synchronized cells from UV irradiation. Exponentially growing cultures were synchronized in G2/M by nocodazole or in G1 with alpha-factor before irradiation with a

dose of 150 J/m^2 . The FACS of yeast cultures show that cells arrested at the predicted phases of the cell cycle (Fig. 4A). Cells recovery from UV irradiation was analyzed as described in the previous sections. The assay does not detect any difference between arrested cells in time of cell growth recovery, before UV irradiation (Fig. 4B, 0 J/m^2). [We note that although there is a slight delay in cell growth for synchronized vs. non-synchronized cultures, this is not shown by the plots since the scale of the x-axis is 8 hrs and multiples thereof]. The cell recovery from UV irradiation is shown in figure 4B (150 J/m^2). Cells arrested and irradiated in G2 phase recover much faster than the non-synchronised cells (NS), which contain approximately 60% G1- and 40% G2-cells. Furthermore, cells arrested in G1 phase recover at an even slower pace. These results suggest that in G2, the activity of the two repair pathways render the cells more resistant to UV light.

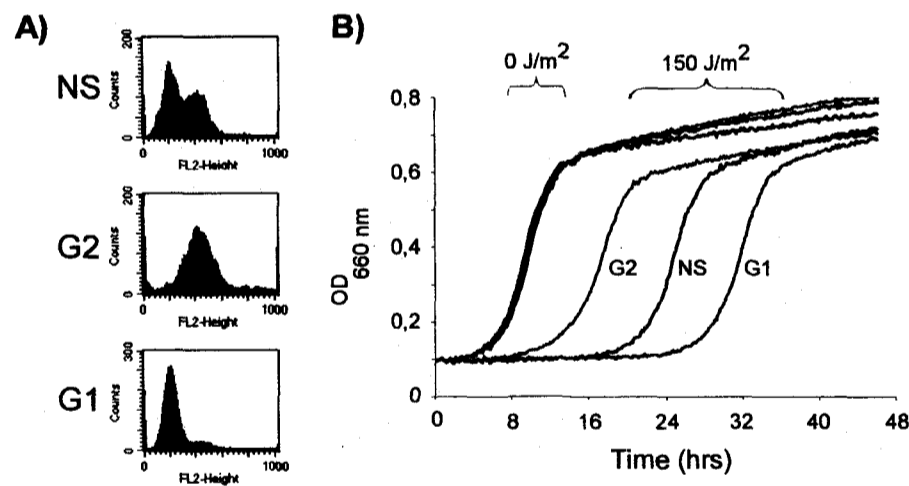


Fig. 4. Exposure of non-synchronized, G2 synchronized and G1 synchronized WT cells to UV irradiation. (A) WT cells were grown exponentially and suspended in fresh YEPD (non-synchronized), in fresh YEPD with $10 \mu\text{g/ml}$ of nocodazol (G2 synchronization), and in fresh YEPD with $1 \mu\text{g/ml}$ of alpha factor (G1 synchronization), incubated and prepared for FACS analyses as described in materials and methods. (B) Aliquot of synchronized and non-synchronized cells were mock treated (0 J/m^2) or UV irradiated with 150 J/m^2 . Then, 4×10^4 cells were deposited in triplicate in 96-well plates. Cell densities were measured every 10 min for 48 h.

To determine the participation of HR and NER in the accelerated recovery of G2-cells (Fig. 4B), additional experiments were done by irradiating strains carrying deletions of one of the genes from the *RAD52* epistasis group with 100 J/m², or by irradiating strains carrying deletions of one of the representative NER genes of group-II with 80 J/m². Strains carrying deletions of group-I NER genes are highly sensitive to UV and, therefore, could not be used. Both non-synchronized and synchronized cells in G2/M were irradiated, their recovery was followed with the growth curve assay and the corresponding RTs were calculated. As shown in figure 5, WT cells synchronized in G2/M recovered ~ 5 h sooner than asynchronous cells after irradiation with 100 J/m², and ~ 2 h after irradiation with 80 J/m² (WT; compare filled with empty bars in Fig 5A and B). As expected, asynchronous and synchronized yeast are more sensitive to UV when HR or NER are impaired (compare WT with HR and NER depleted strains). Interestingly, recovery of non-synchronized vs. synchronized HR mutants (*mre11Δ*, *rad50Δ*, *xrs2Δ*, *rad51Δ*, *rad52Δ*, *rad54Δ*, *rad55Δ*) and GG-NER mutants (*rad7Δ* and *rad16Δ*) proceeds at similar rates (compare empty with filled bars in Fig 5A and B), showing that HR and GG-NER co-participate during the G2/M phases to repair UV induced DNA damage. On the contrary, recovery of TC-NER mutants (*rad26Δ* and *rad34Δ*) is faster in G2/M synchronized cells than in asynchronous cells. These results suggest that HR assists mostly GG-NER in the recovery from UV induced DNA damage when cells are in the G2/M phase of the cell cycle.

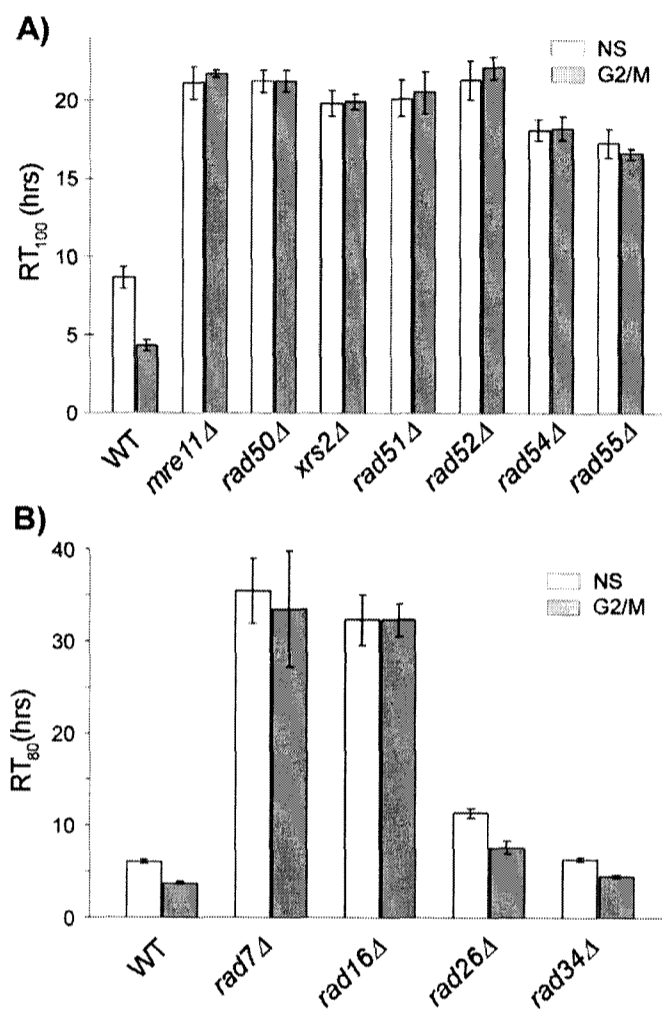
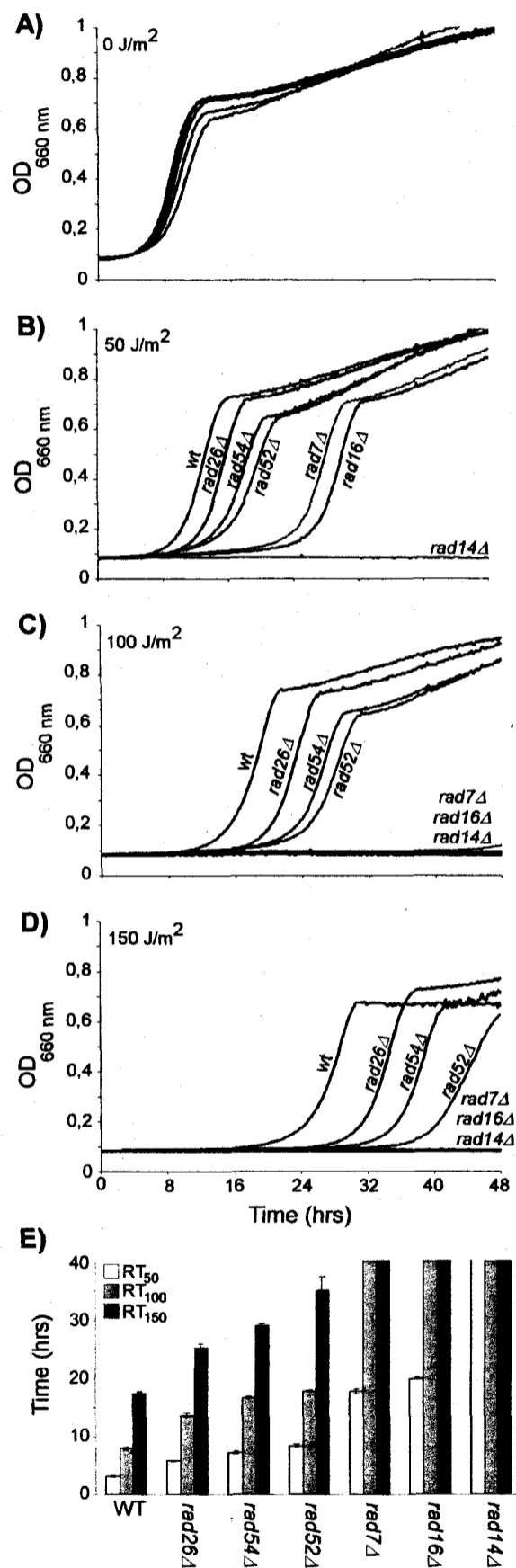


Fig. 5. Exposure of non-synchronized and G2 synchronized HR and NER mutant cells. (A) WT, *mre11Δ*, *rad50Δ*, *xrs2Δ*, *rad51Δ*, *rad52Δ*, *rad54Δ*, *rad55Δ*, and (B) WT, *rad7Δ*, *rad16Δ*, *rad26Δ* and *rad34Δ*, were exposed to UV irradiation at the indicated doses. Yeast strains were grown, synchronized and UV irradiated as described in figure 4. Analyses of cells recovery were done as in figure 1A and the RT values were calculated as in figure 1C. White bars: non-synchronized (NS) cells. Grey bars: G2-synchronized (G2/M) cells. Values represent the mean \pm 1 S.E. of three independent experiments for (A) and \pm 1 SD of three independent growth curves for (B).

3.5 HR and NER participate to different extents in the recovery of cell growth after UV irradiation

Although NER is the main pathway that removes UV photoproducts [9], HR is also involved [22,23] and it is clearly important for cell cycle specific recovery after UV irradiation (Figs. 4 and 5). However, to date, it is not described the extent of the participation of the two repair pathways in cells survival after UV irradiation. For this purpose, WT and selected knockout strains of genes involved in NER and HR were irradiated with doses of 50, 100 and 150 J/m² of UV light, and cell survival was monitored with the growth curve assay. The UV sensitivities of *rad52Δ* and *rad54Δ* strains, which were chosen from the experiments presented in figure 5, were measured against the UV sensitivities of mutants in the NER pathway: *rad14Δ*, *rad7Δ* with *rad16Δ*, and *rad26Δ* which are respectively highly, moderately and lowly sensitive to UV irradiation [9,60]. The results show that all strains grow at very similar rates before UV irradiation (Fig. 6A). At the lowest dose of 50 J/m², recovery of growth for WT cells is only slightly affected, growth of *rad14Δ* is completely arrested, and the recovery of *rad7Δ* and *rad16Δ* cells clearly show their mid-sensitivity to UV light (Fig. 6B). After irradiation with higher doses (100 and 150 J/m²), *rad7Δ* and *rad16Δ* do not recover growth and the sensitivity of *rad26Δ* becomes evident (Figs. 6C and 6D). The UV sensitivity of *rad52Δ* and *rad54Δ* is between the low- and mid- sensitivities of *rad26Δ* and *rad7,16Δ* strains, respectively (Figs. 6B-D). Figure 6E portrays the RT values obtained from the growth curves. The Rad7p and Rad16p form a complex and, thus, *rad7Δ* and *rad16Δ* cells treated with 50 J/m² show similar recovery times (17.7 h and



19.9 h, respectively). No RT can be calculated for *rad14Δ* at 50 J/m² and for *rad14Δ*, *rad7Δ* and *rad16Δ* at 150 J/m², since the strains do not grow after irradiation at these UV doses. This set of experiments (Figs. 5 and 6) demonstrates that in asynchronously growing cultures (~60% G1- and 40% G2-cells), NER is the major repair pathway for yeast cells survival to UV irradiation. However, both HR and NER co-participate in yeast survival to UV irradiation when cells have two sister chromatids.

Fig. 6. Exposure of WT, *rad14Δ*, *rad7Δ*, *rad16Δ*, *rad26Δ*, *rad52Δ* and *rad54Δ* to UV irradiation. Analyses of cells concentrations by optical densities (OD₆₆₀) for the indicated yeast strains that were (A) mock treated (0 J/m²) or irradiated with (B) 50 J/m², (C) 100 J/m², (D) 150 J/m². (E) The respective RT values were calculated as described in figure 1C. White bars: 50 J/m²; gray bars: 100 J/m²; black bars: 150 J/m². Values represent the mean ± 1 S.D. of three independent experiments.

Conclusions

Analyses of cell growth curves showed that *sir* Δ strains are more resistant to UV light than the WT. We demonstrated that Sir proteins are not directly involved in this phenotype, but rather the intrinsic pseudo-diploidy of *sir* Δ mutants, which is due to the expression of “a” and “ α ” mating type in absence of Sir mediated silencing, is responsible for fast recovery after UV irradiation. Moreover, we found that HR contributes to the UV resistance phenotype of pseudo-diploid cells. Also, HR and GG-NER are implicated in cell cycle dependent survival to UV irradiation, and this report shows that cells synchronized in the G2/M phase of the cell cycle are more resistant to UV compared to non-synchronized and G1 synchronized cells. Therefore, both HR and GG-NER participate in the recovery of G2/M cells from UV irradiation. We suggest that the combined activities of HR and GG-NER (when two copies of the chromosomes are present) explain the higher resistance of G2 cells vs. G1 haploid cells. Taken together these results underscore the role of crosstalk that occurs between HR and NER in cells survival. With this study we provide detailed and quantitative information on the co-participation of HR and NER in UV survival of yeast cells.

Acknowledgments

We thank Dr Kobrin at the Université de Sherbrooke for critical reading of the manuscript. Also, we would like to thank Dr Rivier for the gift of the pDR589 plasmid, Dr Rine for the gift of the JRY strains, Luc Grenier for the data analyses and Leonid Volkov at the Centre de recherche Clinique Etienne-Le Bel for help with FACS analysis. This work was supported by the grant from the Nat. Sci. Eng. Res. Coun. Can. (NSERC) to AC. M. Toussaint was supported in part by a NSERC fellowship and in part by the NSERC grant to AC. RJW was supported by a grant of the Canadian Institutes of Health Research to RJW (CIHR grant MOP 12616). There are no conflicts of interest.

References

- [1] E.C. Friedberg, DNA repair and mutagenesis, ASM Press, Washington, D.C., 2006.
- [2] J.H. Hoeijmakers, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature* 411 (2001) 366-374.
- [3] A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, S. Linn, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, *Annu Rev Biochem* 73 (2004) 39-85.
- [4] M.S. Sasaki, Advances in the biophysical and molecular bases of radiation cytogenetics, *Int J Radiat Biol* 85 (2009) 26-47.
- [5] M. Segurado, J.A. Tercero, The S-phase checkpoint: targeting the replication fork, *Biol Cell* 101 (2009) 617-627.
- [6] A.M. Friedel, B.L. Pike, S.M. Gasser, ATR/Mec1: coordinating fork stability and repair, *Curr Opin Cell Biol* 21 (2009) 237-244.
- [7] B. Pardo, B. Gomez-Gonzalez, A. Aguilera, DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship, *Cell Mol Life Sci* 66 (2009) 1039-1056.
- [8] B.O. Krogh, L.S. Symington, Recombination proteins in yeast, *Annu Rev Genet* 38 (2004) 233-271.
- [9] S. Prakash, L. Prakash, Nucleotide excision repair in yeast, *Mutat Res* 451 (2000) 13-24.

- [10] P.C. Hanawalt, G. Spivak, Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008) 958-970.
- [11] M.J. Smerdon, F. Thoma, Site-specific DNA repair at the nucleosome level in a yeast minichromosome, *Cell* 61 (1990) 675-684.
- [12] R.A. Verhage, P. Van de Putte, J. Brouwer, Repair of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: RAD4-independent strand-specific nucleotide excision repair of RNA polymerase I transcribed genes, *Nucleic Acids Res* 24 (1996) 1020-1025.
- [13] A. Conconi, V.A. Bessalov, M.J. Smerdon, Transcription-coupled repair in RNA polymerase I-transcribed genes of yeast, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 649-654.
- [14] A. Meier, M. Livingstone-Zatchej, F. Thoma, Repair of active and silenced rDNA in yeast: the contributions of photolyase and transcription-coupled nucleotide excision repair, *J Biol Chem* 277 (2002) 11845-11852.
- [15] A. Conconi, M. Paquette, D. Fahy, V.A. Bessalov, M.J. Smerdon, Repair-independent chromatin assembly onto active ribosomal genes in yeast after UV irradiation, *Mol Cell Biol* 25 (2005) 9773-9783.
- [16] A.J. van Gool, R. Verhage, S.M. Swagemakers, P. van de Putte, J. Brouwer, C. Troelstra, D. Bootsma, J.H. Hoeijmakers, RAD26, the functional *S. cerevisiae* homolog of the Cockayne syndrome B gene ERCC6, *EMBO J* 13 (1994) 5361-5369.
- [17] B. den Dulk, J.A. Brandsma, J. Brouwer, The Rad4 homologue YDR314C is essential for strand-specific repair of RNA polymerase I-transcribed rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Microbiol* 56 (2005) 1518-1526.

- [18] M. Tremblay, Y. Teng, M. Paquette, R. Waters, A. Conconi, Complementary roles of yeast Rad4p and Rad34p in nucleotide excision repair of active and inactive rRNA gene chromatin, *Mol Cell Biol* 28 (2008) 7504-7513.
- [19] S. Yu, T. Owen-Hughes, E.C. Friedberg, R. Waters, S.H. Reed, The yeast Rad7/Rad16/Abf1 complex generates superhelical torsion in DNA that is required for nucleotide excision repair, *DNA Repair (Amst)* 3 (2004) 277-287.
- [20] A. Aboussekhra, I.S. Al-Sharif, Homologous recombination is involved in transcription-coupled repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J* 24 (2005) 1999-2010.
- [21] T. Nakano, S. Morishita, A. Katafuchi, M. Matsubara, Y. Horikawa, H. Terato, A.M. Salem, S. Izumi, S.P. Pack, K. Makino, H. Ide, Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks, *Mol Cell* 28 (2007) 147-158.
- [22] V. Gangavarapu, S. Prakash, L. Prakash, Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* 27 (2007) 7758-7764.
- [23] S.R. Santa Maria, V. Gangavarapu, R.E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, Requirement of Nse1, a subunit of the Smc5-Smc6 complex, for Rad52-dependent postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* 27 (2007) 8409-8418.
- [24] E.L. Ivanov, J.E. Haber, RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* 15 (1995) 2245-2251.

- [25] G. Lettier, Q. Feng, A.A. de Mayolo, N. Erdeniz, R.J. Reid, M. Lisby, U.H. Mortensen, R. Rothstein, The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in *S. cerevisiae*, *PLoS Genet* 2 (2006) e194.
- [26] G. Grompone, N. Sanchez, S. Dusko Ehrlich, B. Michel, Requirement for RecFOR-mediated recombination in *priA* mutant, *Mol Microbiol* 52 (2004) 551-562.
- [27] A. Kuzminov, Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda, *Microbiol Mol Biol Rev* 63 (1999) 751-813, table of contents.
- [28] Y.C. Tseng, J.L. Hung, T.C. Wang, Involvement of RecF pathway recombination genes in postreplication repair in UV-irradiated *Escherichia coli* cells, *Mutat Res* 315 (1994) 1-9.
- [29] K. Morimatsu, S.C. Kowalczykowski, RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair, *Mol Cell* 11 (2003) 1337-1347.
- [30] F. Fabre, H. Roman, Genetic evidence for inducibility of recombination competence in yeast, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977) 1667-1671.
- [31] J.R. Simon, P.D. Moore, Induction of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Gen Genet* 214 (1988) 37-41.
- [32] S. Nakai, R.K. Mortimer, Studies on the genetic mechanism of radiation-induced mitotic segregation in yeast, *Mol Gen Genet* 103 (1969) 329-338.

- [33] A. Galli, R.H. Schiestl, On the mechanism of UV and gamma-ray-induced intrachromosomal recombination in yeast cells synchronized in different stages of the cell cycle, *Mol Gen Genet* 248 (1995) 301-310.
- [34] S. Prakash, L. Prakash, W. Burke, B.A. Montelone, Effects of the RAD52 Gene on Recombination in *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, *Genetics* 94 (1980) 31-50.
- [35] F. Thoma, Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair, *EMBO J* 18 (1999) 6585-6598.
- [36] A. Groth, W. Rocha, A. Verreault, G. Almouzni, Chromatin challenges during DNA replication and repair, *Cell* 128 (2007) 721-733.
- [37] S. Chaudhuri, J.J. Wyrick, M.J. Smerdon, Histone H3 Lys79 methylation is required for efficient nucleotide excision repair in a silenced locus of *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res* 37 (2009) 1690-1700.
- [38] R. Waters, S.H. Reed, Y. Yu, Y. Teng, Chromatin modifications and nucleotide excision repair, *SEB Exp Biol Ser* 59 (2008) 189-201.
- [39] M.J. Smerdon, A. Conconi, Modulation of DNA damage and DNA repair in chromatin, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62 (1999) 227-255.
- [40] M. Tremblay, M. Toussaint, A. D'Amours, A. Conconi, Nucleotide excision repair and photolyase repair of UV photoproducts in nucleosomes: assessing the existence of nucleosome and non-nucleosome rDNA chromatin in vivo, *Biochem Cell Biol* 87 (2009) 337-346.
- [41] S.M. Gasser, M.M. Cockell, The molecular biology of the SIR proteins, *Gene* 279 (2001) 1-16.

- [42] W.H. Tham, V.A. Zakian, Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms, *Oncogene* 21 (2002) 512-521.
- [43] D. Moazed, Common themes in mechanisms of gene silencing, *Mol Cell* 8 (2001) 489-498.
- [44] J.E. Haber, Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annu Rev Genet* 32 (1998) 561-599.
- [45] L.N. Rusche, A.L. Kirchmaier, J. Rine, The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annu Rev Biochem* 72 (2003) 481-516.
- [46] T.S. Fisher, V.A. Zakian, Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance, *DNA Repair (Amst)* 4 (2005) 1215-1226.
- [47] D. Moazed, A.D. Rudner, J. Huang, G.J. Hoppe, J.C. Tanny, A model for step-wise assembly of heterochromatin in yeast, *Novartis Found Symp* 259 (2004) 48-56; discussion 56-62, 163-169.
- [48] A.S. Sperling, M. Grunstein, Histone H3 N-terminus regulates higher order structure of yeast heterochromatin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 13153-13159.
- [49] M. Cockell, M. Gotta, F. Palladino, S.G. Martin, S.M. Gasser, Targeting Sir proteins to sites of action: a general mechanism for regulated repression, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63 (1998) 401-412.
- [50] J. Rine, I. Herskowitz, Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 116 (1987) 9-22.

- [51] S.U. Astrom, S.M. Okamura, J. Rine, Yeast cell-type regulation of DNA repair, *Nature* 397 (1999) 310.
- [52] C. Terleth, C.A. van Sluis, P. van de Putte, Differential repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res* 17 (1989) 4433-4439.
- [53] C. Terleth, P. Schenk, R. Poot, J. Brouwer, P. van de Putte, Differential repair of UV damage in rad mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: a possible function of G2 arrest upon UV irradiation, *Mol Cell Biol* 10 (1990) 4678-4684.
- [54] M. Livingstone-Zatchej, R. Marcionelli, K. Moller, R. de Pril, F. Thoma, Repair of UV lesions in silenced chromatin provides in vivo evidence for a compact chromatin structure, *J Biol Chem* 278 (2003) 37471-37479.
- [55] E.A. Winzeler, D.D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J.D. Boeke, H. Bussey, A.M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S.W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S.H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J.H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D.J. Lockhart, A. Lucau-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J.L. Revuelta, L. Riles, C.J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R.K. Storms, S. Veronneau, M. Voet, G. Volckaert, T.R. Ward, R. Wysocki, G.S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston, R.W. Davis, Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis, *Science* 285 (1999) 901-906.
- [56] C.B. Brachmann, A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, J.D. Boeke, Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful

set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications, *Yeast* 14 (1998) 115-132.

- [57] R.S. Sikorski, P. Hieter, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 122 (1989) 19-27.
- [58] A. Meier, F. Thoma, RNA polymerase I transcription factors in active yeast rRNA gene promoters enhance UV damage formation and inhibit repair, *Mol Cell Biol* 25 (2005) 1586-1595.
- [59] M. Toussaint, A. Conconi, High-throughput and sensitive assay to measure yeast cell growth: a bench protocol for testing genotoxic agents, *Nat Protoc* 1 (2006) 1922-1928.
- [60] M. Toussaint, G. Levasseur, J. Gervais-Bird, R.J. Wellinger, S.A. Elela, A. Conconi, A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures, *Mutat Res* 606 (2006) 92-105.
- [61] M. Heude, F. Fabre, α -control of DNA repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and physiological aspects, *Genetics* 133 (1993) 489-498.
- [62] R. LaTarjet, B. Ephrussi, Courbes de survie de levures haploides et diploides soumises aux rayons-X., *Compt. rend.* 229 (1949) 306-308
- [63] M. Fasullo, P. Dave, Mating type regulates the radiation-associated stimulation of reciprocal translocation events in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Gen Genet* 243 (1994) 63-70.
- [64] B.E. Bernstein, J.K. Tong, S.L. Schreiber, Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 13708-13713.

- [65] L. Lommel, C. Carswell-Crumpton, P.C. Hanawalt, Preferential repair of the transcribed DNA strand in the dihydrofolate reductase gene throughout the cell cycle in UV-irradiated human cells, *Mutat Res* 336 (1995) 181-192.
- [66] A.D. Scott, R. Waters, Inducible nucleotide excision repair (NER) of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in the cell cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence that inducible NER is confined to the G1 phase of the mitotic cell cycle, *Mol Gen Genet* 254 (1997) 43-53.
- [67] C. Terleth, R. Waters, J. Brouwer, P. van de Putte, Differential repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae* is cell cycle dependent, *EMBO J* 9 (1990) 2899-2904.
- [68] C. Terleth, R. Waters, J. Brouwer, P. van de Putte, Differential repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae* is cell cycle dependent, *EMBO J* 11 (1992) 1228.
- [69] M. Lisby, U.H. Mortensen, R. Rothstein, Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre, *Nat Cell Biol* 5 (2003) 572-577.

4 – Analyse de la réparation de l'ADN dans les régions hétérochromatiques

Tel que mentionné précédemment, l'un des intérêts principal du laboratoire Conconi est de comprendre comment fonctionne la réparation des CPD dans différentes formes de chromatine. Le volet 1 de cette thèse a permis d'identifier quatre gènes affectant la récupération des cellules après irradiation aux rayons UV. De ces mutants, j'ai présenté la caractérisation du mutant *sir2Δ* et démontré que la recombinaison homologe présente dans les cellules pseudoploïdes est responsable du phénotype de résistance identifié. Afin d'analyser l'impact de l'hétérochromatine sur la réparation des dommages créés par les UV, qui consiste au volet 2 de cette thèse, nous avons procédé à l'étude de la cinétique de réparation du locus du type sexuel et des télomères chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, deux régions présentant une forme hétérochromatique d'ADN. Les résultats de ces travaux sont présentés dans cette quatrième section.

4.1 – Matériel et méthodes

4.1.2 – Souches

Les souches utilisées (type sauvage, *sir2Δ*, *sir3Δ* et *rad26Δ*), proviennent de la collection de mutants dérivés de la souche BY4741 (WINZELER *et al.*, 1999).

4.1.3 – Analyse de la cinétique de réparation de l'ADN par l'endonucléase V du phage T4

4.1.3.1 – Irradiation des cellules

Pour une expérience d'irradiation, 1 L de milieu de culture complet (YEPD : 1% extrait de levures, 2% peptone, 2% glucose) est inoculé avec la souche à analyser et cultivé à 30°C toute une nuit jusqu'à l'obtention de la phase exponentielle de croissance ($\sim 1,2 \times 10^7$ Cellule/ml, soit $DO_{660nm} = 0.4$). Les cellules sont récupérées par centrifugation et remises en suspension dans 300 ml de tampon PBS (137 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , pH7) duquel est récupéré dans un tube Falcon (50 ml) un aliquot de 50 ml de cellules correspondant à l'échantillon sans irradiation (identifié « - UV ») et qui est conservé sur glace. Par la suite, le 250 ml restant est irradié dans un support de plastique avec $180 J/m^2$ de rayons UVC (254 nm), évalué avec un compteur UVX (Ultra-Violet Products, Upland, Californie), en s'assurant que l'épaisseur formée par le volume irradié ne dépasse pas 2 mm afin d'éviter que le PBS filtre les rayons UV. Les cellules irradiées sont combinées dans un seul contenant duquel on récupère 50 ml de cellules dans un tube Falcon, correspondant à l'échantillon irradié sans réparation (identifié « 0' ») et qui est conservé sur glace au noir. Par la suite, le volume de 200 ml de cellules restant est centrifugé, de sorte que les cellules irradiées sont remises en suspension dans 200 ml de milieu riche préchauffé (YEPD) pour incubation dans le noir à 30°C. Après 30', 1 h, 2 h, et 4 h d'incubation, un aliquot de 50 ml de milieux de cultures contenant les cellules en réparation est récupéré dans un tube Falcon et identifié selon le

temps de réparation en question. Les échantillons « -UV » et « 0' », de même que chaque aliquot de 50 µl, sont traités dès que possible de la façon suivante. Centrifuger à 3500 RPM pendant 2 min afin de récupérer les cellules, laver une fois dans 30 ml de PBS 1X, recentrifuger, remettre en suspension dans 1,5 ml de NIB (50 mM MOPS pH 8, 150 mM K-acetate, 2 mM MgCl₂, 17% glycerol, 0,5 mM spermine, 0,15mM spermidine), transférer dans un tube falcon 15 ml à fond rond contenant 1,5 ml de billes de verre de 425 – 600 µm (sigma no. de cat. G8772-500g), et congeler à -80 °C au noir.

4.1.3.2 – Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN procède en deux étapes, soit l'isolation des noyaux suivie de l'extraction de l'ADN à partir des noyaux. Un maximum de deux échantillons sont traités en simultanée (p.ex. : échantillon « -UV » et « 0' »). Chaque étape précédant l'extraction des protéines au phénol/chloroforme est effectuée sous lumière jaune afin d'éviter l'activation de la photolyase qui nuirait à l'interprétation des résultats. Pour procéder à l'isolation des noyaux, 66,7 µl de Triton X-100 4,5 % est ajouté à chaque échantillon une fois dégelé sur glace. Les tubes sont agités vigoureusement 10 fois 30 secondes à l'aide d'un vortex en alternant avec un passage sur glace de 30 sec. Par la suite, le lysat cellulaire, qui contient les noyaux, est transféré dans un nouveau tube falcon 15 ml à fond rond et conservé sur glace le temps de rincer les billes de verre deux fois avec 1 ml de NIB afin de récupérer le maximum de lysat, lequel est ajouté au tube de lysat cellulaire. Ce dernier est centrifugé à 3 500 RPM dans une centrifugeuse de table pendant 2,5 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires qui précipitent (parois, membranes, etc.), et

recupérer les noyaux en transférant doucement le surnageant dans un tube Eppendorf 2 ml, sans toucher le culot de débris. Le culot de débris est rincé deux fois avec 1 ml de NIB, et recentrifugé tel que décrit pour précipiter à nouveau les débris, afin d'extraire le maximum de noyaux dans le surnageant, qui est combiné au tube eppendorf 2 ml, encore une fois en prenant garde de ne pas toucher le culot de débris. Par la suite, le surnageant présent dans le tube Eppendorf 2 ml est centrifugé à 13 000 RPM dans une microcentrifugeuse pendant cinq minutes, le tube est décanté pour éliminer le maximum de surnageant et le culot de noyaux est resuspendu doucement dans 500 µl NIB. Il faut s'assurer que tous les noyaux sont resuspendus et qu'une suspension homogène est obtenue. Les noyaux peuvent être conservés dans le NIB à -80°C au noir en attendant que tous les échantillons de noyaux provenant d'une expérience d'irradiation complète (contenant tous les points de réparation : -UV; 0', 30'; 1 h; 2 h et 4 h) soient isolés. Pour extraire l'ADN des noyaux, ajouter à chaque tube contenant les noyaux dégelés sur glace; 225 µl de sodium acétate (NaOAc) 3 M pH 5,5 et 35 µl SDS 10 %. Agiter doucement entre chaque ajout afin d'homogénéiser le mélange. Extraire les protéines deux fois à l'aide de 500 µl phenol/chloroform/isoamyl alcohol 25:24:1 (équilibré dans du Tris-HCl pH 9,0) et une fois dans 500 µl de chloroform. À cette étape, il est maintenant possible de travailler sous la lumière blanche étant donné l'inactivation et l'extraction des protéines et par conséquent de la photolyase par le phénol. Ajouter 1 ml d'isopropanol, mélanger doucement par inversion et laisser précipiter l'ADN 20 minutes à -80°C. Centrifuger à 13 000 RPM pendant 20 minutes dans une microcentrifugeuse réfrigérée (4°C), décanter doucement le surnageant et laisser sécher quelques minutes le culot sous vide. Remettre en suspension le culot contenant l'ADN et l'ARN dans 500 µl TE (10 mM Tris-HCl pH

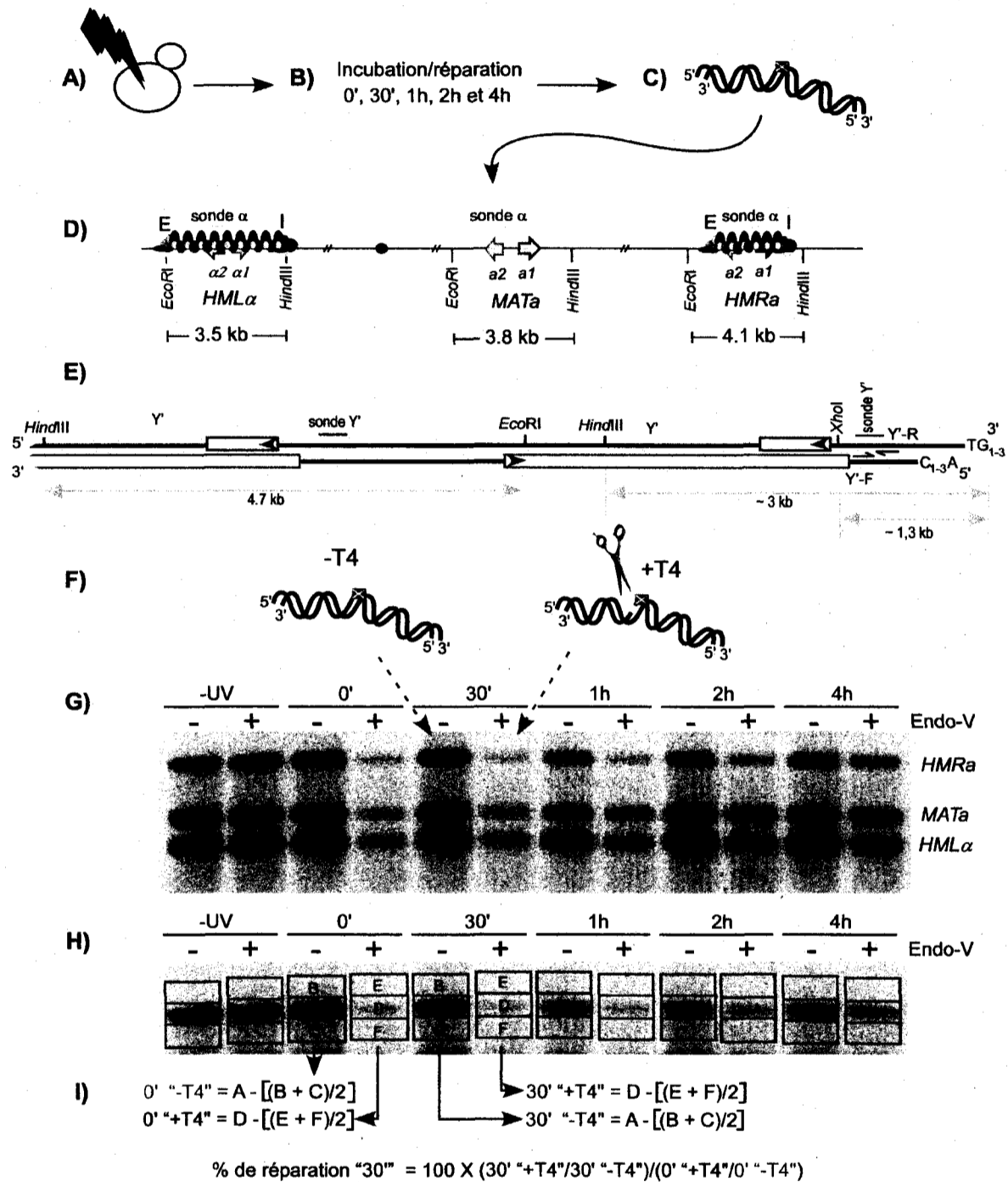


Figure 11 : Schéma de la méthode d'analyse de la cinétique de réparation des CPD par l'endonuclease-V du phage T4. (A) Les cellules de levure *S. cerevisiae* sont irradiées avec des rayons UV, (B) et remises en culture dans du milieu frais pour différents temps de réparation. (C) Par la suite, l'ADN de chaque temps de réparation est extrait, et (D) (E) digéré avec les enzymes de restrictions de choix selon l'analyse désiré. (F) Chaque échantillon est séparé en deux aliquotes de volumes identiques. L'une n'est pas traitée, alors que l'autre est traitée avec l'endonuclease V du phage T4, qui crée un bris simple brin de l'ADN en 5' de chaque CPD. (G) Les échantillons sont séparés par migration sur gel d'agarose dénaturant, (H) et dosé pour évaluer le pourcentage de réparation de chaque temps de réparation. (I) Un exemple de calcul est présenté pour évaluer le pourcentage de réparation après 30' d'incubation dans du milieu frais.

8,0, 100 mM EDTA) et 10 µl RNase A (10 mg/ml). Incuber à 37°C pendant 30 minutes. Ajouter 225 µl NaOAc 3 M pH 5,5, 35 µl SDS 10 % et agiter doucement entre chaque ajout afin d'homogénéiser le mélange. Extraire une fois à l'aide de 500 µl phenol/chloroform/isoamyl alcohol 25:24:1 (équilibré dans du Tris-HCl pH 9,0) et une fois dans 500 µl de chloroforme, ajouter 1 ml d'isopropanol, mélanger doucement par inversion et laisser précipiter l'ADN 20 minutes à -80°C. Centrifuger à 13 000 RPM pendant 20 minutes dans une microcentrifugeuse réfrigérée (4°C), décanter doucement le surnageant, ajouter 1 ml d'éthanol 70 % afin de laver le culot d'ADN et centrifuger à nouveau à 13 000 RPM pendant 20 minutes dans une microcentrifugeuse réfrigérée. Décanter doucement pour éliminer le surnageant et laisser sécher le culot contenant l'ADN sous vide. Par la suite, l'ADN est remis en suspension dans 50 µl de TE. Au besoin, vérifier la qualité de l'ADN obtenu ainsi que la concentration à l'aide d'un gel d'agarose analytique.

4.1.3.3 – Digestion de l'ADN et traitement par l'endonucléase V du phage T4

Environ 2 µg d'ADN est digéré dans le tampon approprié selon les enzymes de restrictions choisies dans un volume final de 100 µl. La combinaison d'enzymes *EcoRI* et *HindIII* permet l'analyse de la réparation du locus du type sexuel (loci, *HML*, *MAT* et *HMR*) (figure 10D), de même que la réparation des fragments télomériques et sous télomériques (figure 10E). En outre, l'utilisation de l'enzyme *XhoI* permet l'analyse d'un fragment télomérique terminal de 1,3 kb plus court que ce qui est libéré avec l'utilisation de *HindIII* (figure 10E). Par la suite, ajouter 100 µl de TE et effectuer une extraction au

phénol/chloroforme/isoamyl alcohol 25:24:1 (équilibré dans du Tris-HCl pH 9,0), suivie d'une extraction au chloroforme pour éliminer les enzymes. Ajouter 20 µl de NaOAc 3 M pH 5.5 et 550 µl d'éthanol 100 %. Laisser précipiter l'ADN à -80°C pendant 20 minutes, centrifuger à 14 000 RPM dans une microcentrifugeuse réfrigérée, décanter le surnageant et rincer le culot d'ADN avec 1 ml d'éthanol 70 %. Centrifuger à nouveau à 14 000 RPM dans une microcentrifugeuse réfrigérée pendant 10 minutes, décanter le surnageant et laisser sécher le culot sous vide. Par la suite, l'ADN digéré est remis en suspension dans 34 µl de tampon de réaction de T4 1X (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA). Chaque échantillon (-UV, 0', 30', 1 h, 2 h et 4 h) est séparé en deux parties parfaitement égales de 15 µl dans deux tubes de 0,5 ml identifiés avec le temps de réparation. Pour chaque temps de réparation, 2 µl d'endonucléase V du phage T4 (Epicentre, no. de cat. TE665K) est ajouté au premier tube pré-identifié « +T4 », alors que 2 µl de tampon T4 1X est ajouté au tube non traité, pré-identifié « -T4 ». La réaction est incubée à 37°C pendant 1 heure. Avant la migration sur gel, 3 µl de tampon de chargement 6X (300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 18% Ficoll (type 400), 0,15% Bromocresol vert, 0,25% Xylene cyanol) est ajouté à tous les tubes. La figure 11 représente schématiquement la procédure suivie pour l'analyse de la réparation et le fonctionnement de l'endonucléase V du phage T4.

4.1.3.4 – Buvardage de type Southern

Pour l'analyse de la réparation par buvardage de type Southern, il faut premièrement couler un maxi-gel dénaturant (20 cm de large par 25 cm de long; 1 % agarose, 0,05 M NaCl, 1 mM EDTA) et laisser figer au moins 1 à 2 heures à température pièce. Équilibrer

le gel dans du tampon de migration (50 mM NaOH, 1 mM EDTA) pour un minimum de 16 heures. Par la suite, déposer le gel dans le montage de migration et le couvrir avec du tampon de migration fraîchement préparé. Charger délicatement, exactement 20 μ l des échantillons en s'assurant de ne pas en perdre dans le tampon de migration. En effet, toute perte d'échantillon faussera le dosage puisqu'une quantité d'ADN sera perdue. Faire migrer à 35 V pendant un total de 43 h. Démarrer une pompe pour faire recirculer le tampon de migration après 1 à 2 heures de migration, afin d'éviter qu'un gradient d'ions se forme dans le tampon de migration. De plus, changer le tampon pour du tampon fraîchement préparé après environ 24 heures de migration. Une fois la migration terminée, retirer le gel de son plateau et couper les parties de gel inutile, en fonction de la portion désirée. Dans le cas de l'analyse de la réparation du locus du type sexuel et des télomères, retirer 1 cm de gel à partir du bas du gel, 12 cm à partir du haut, et 2,5 cm de chaque côté, ce qui permet d'obtenir une dimension finale interne du gel à conserver de 15 cm de large par 12 cm de long. Déposer le gel doucement, face vers le bas, dans un plat pyrex contenant du tampon de transfert (0,4 M NaOH). Pendant ce temps, découper 5 papiers Whatman (Fisher scientific, no de cat. 05714-4) et une membrane HybondTM-XL (GE Healthcare, no de cat. RPN303S) selon les mêmes dimensions que le gel, et laisser tremper quelques minutes la membrane dans du tampon 2X SSC. Préparer le montage de buvardage à la Southern tel que décrit dans (SOUTHERN, 2006) avec du tampon de transfert NaOH 0,4 M, et laisser transférer pendant une nuit. Par la suite, soumettre la membrane au *UV crosslinker* pour assurer le photopontage de l'ADN sur son support, rincer la membrane dans un tube à hybridation pendant 15 min à 68°C dans du tampon phosphate (0,5 M Na₂HPO₄). La pré-hybridation s'effectue pendant 1 heure à 68°C avec

de la solution d'hybridation (0,5 M Na₂HPO₄, 1 % (P/V) BSA, 1 mM EDTA, 1µg/ml tRNA, 7 % (P/V) SDS). Dans le cas des sondes d'ADN double brin (sonde α et Y') (figure 10D et E), la sonde pré-bouillie est ajoutée directement au liquide d'hybridation et laisser pendant 16 heures à 68°C pour l'hybridation. Par la suite, laver la membrane à 68°C successivement 4 fois 10 minutes avec 4 solutions de lavages différentes (1- 0,5 M Na₂HPO₄, 1 % (P /V) SDS, 2- 0,25 M Na₂HPO₄, 0,5 % (P /V) SDS, 3-0,1 M Na₂HPO₄, 0,5 % (P /V) SDS et 4- 0,05 M Na₂HPO₄, 0,5 % (P /V) SDS). Dans le cas des oligonucléotides Y'-F et Y'-R (figure 11E), l'hybridation procède de façon identique à l'exception que les sondes ne sont pas bouillies, et que la pré-hybridation, l'hybridation, de même que les lavages, procèdent à 37°C. Une fois les lavages terminés, la membrane est séchée brièvement à l'air face vers le haut sur un papier Whatman, déposée sur un nouveau papier Whatman sèche pour l'envelopper dans du papier saran. La membrane est placée dans une cassette d'exposition en s'assurant que la surface de la membrane contenant l'ADN soit positionnée face à l'écran d'exposition.

La sonde α correspond à un fragment de 1 kb obtenu par une réaction de PCR sur de l'ADN génomique total avec les oligos Alpha-F (5'-GTAGTGTCTGAGAGGG-3') et Alpha-R (5'-GACTTCCAGACGCTATCCTG-3'). De la même façon, la sonde Y' correspond à un fragment de 600 pb issu d'une réaction de PCR avec le plasmide PVZY'K [plasmide PVZ1 dans lequel un fragment *KpnI* de 600 pb de la séquence Y' a été cloné dans le site *KpnI* du plasmide (LEBEL *et al.*, 2006)] et les oligos PVZY'K-For (5'-ATACGACTCACTATAGGGCGAATT-3') et PVZY'K-Rev (5'-TTAACCCTCACTAAAGGGAACAAA-3'). Les fragments de PCR sont purifiés sur gel

d'agarose, radiomarqués avec des α -dCT³²P à l'aide d'un kit commercial de marquage aléatoire (GE Healthcare, no de cat. 27-9240-01) et purifiés sur une colonne G-50 (GE Healthcare, no. de cat. 28-9034-08) pour éliminer les nucléotides libres provenant de la réaction de marquage. Dans le cas des analyses différentielles de la réparation des deux brins des séquences télomériques (figure 11E), les oligonucléotides Y'-F (5'-GATTCGAGCAGAGAAGTTGGAGAGTGAAGG-3') et Y'-R (5'-TAGCCCTCATGTACGTCTCCTCCAAGCCC-3') ont été utilisés directement et marqués en 5' par un γ -AT³²P selon les méthodes standards (SAMBROOK et RUSSELL, 2001), à l'aide de la polynucléotide kinase purifié sur place par Mme Catherine Desrosier.

4.1.3.5 – Quantification des signaux et de la cinétique de réparation

Pour quantifier la cinétique de réparation, il faut premièrement mesurer l'intensité du signal des bandes obtenues dans chaque piste, de laquelle on retire l'intensité du bruit de fond de la piste. Le bruit de fond est obtenu en faisant la moyenne de l'intensité du signal d'un volume identique au volume utilisé pour doser l'intensité de la bande principale, mesurée directement au dessus, et en dessous de cette dernière. Par la suite, le ratio entre l'intensité du signal dans l'échantillon +T4 par rapport à l'échantillon -T4 (+T4/-T4) est calculé pour chaque temps de réparation. Le ratio obtenu à partir des échantillons à « 0' » de réparation est fixé à 0 % de réparation, alors que le ratio obtenu à partir des échantillons « -UV » est fixé à 100 % de réparation. Par la suite, le ratio de chaque temps de réparation est comparé au ratio obtenu au temps 0 et multiplié par 100 pour obtenir un pourcentage de réparation pour chaque temps analysé (ex. : $100 \times (30' \text{ "+T4"}/30' \text{ "-$

T4")/(0' "+T4"/0' "-T4")) (figure 11I). Les résultats de chaque temps de réparation sont rapportés sur un graphique.

4.2 - Résultats

4.2.1 - Analyse de la cinétique de réparation des dommages créés par les UV dans l'ADN des régions hétérochromatiques

Afin de caractériser l'impact de la présence de l'hétérochromatine construite par les protéines Sir sur la réparation des dommages créés par les UV, nous avons choisi d'analyser la cinétique de réparation du locus du type sexuel et des télomères. Dans l'éventualité où cette structure hétérochromatique construite par les Sir empêcherait l'accès à l'ADN pour la réparation des dommages, nous devrions trouver une diminution de la vitesse de réparation dans les régions où les protéines Sir sont présentes. À l'inverse, si cette hétérochromatine n'a aucun effet sur l'accès à l'ADN et sa réparation, aucun changement ne devrait être détecté dans ces régions par rapport à une région de chromatine dite normale. Par ailleurs, les régions hétérochromatiques sont inactives transcriptionnellement, ce qui fait contraste à l'euchromatine qui est permissive à la transcription. Ainsi, en plus de vérifier quel est l'impact de l'hétérochromatine de la levure *S. cerevisiae*, nous anticipons avoir un système qui pourrait nous permettre d'adresser l'importance de la réparation couplée à la transcription, présente dans les régions permissives à la transcription du génome, par rapport à l'impact d'une chromatine ouverte mais non transcrite. À cet effet, le locus du type sexuel constitue un choix judicieux puisqu'il présente trois régions très semblables quant à la séquence de l'ADN, toutes situées sur le chromosome III à distance les unes des autres (Figure 4), mais qui possèdent la particularité de présenter deux structures de chromatine différentes. En effet,

le locus *MAT* est sous forme de chromatine permissive et par conséquent, il est transcriptionnellement actif. À l'inverse, les loci *HML* et *HMR* sont empaquetés dans une structure hétérochromatique, dans laquelle les protéines Sir sont au cœur (HABER, 1998). Par conséquent, ces loci sont transcriptionnellement silencieux. Ainsi, il est possible de vérifier l'impact sur la réparation de l'ADN de cette structure d'hétérochromatine produite par les protéines Sir en comparant la réparation aux différentes régions du locus du type sexuel. Ceci permet l'analyse de la réparation d'une même séquence d'ADN, mais possédant une structure de chromatine différente, ce qui constitue en fait à un contrôle interne naturel. De plus, il est possible d'ajouter un second niveau de contrôle en retirant les gènes *SIR* et de vérifier l'effet de cette modification sur la réparation desdites régions. Par ailleurs, cette étape de vérification en retirant les gènes *SIR* est aussi possible lors de l'analyse de la cinétique de réparation des dommages créés par les UV dans les télomères.

4.2.1.1 - Analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel dans les cellules de type sauvage

Les cellules de type sauvage ont été cultivées dans du milieu riche pour obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance, irradiées avec 180 J/m^2 d'UV, et remises en culture dans du milieu frais pour différents temps de réparation. L'ADN extrait des cellules obtenues pour chaque temps de réparation a été digéré par les enzymes de restriction *HindIII* et *EcoRI* (Figure 12A). Chaque échantillon est séparé en deux aliquotes identiques, l'une est traitée avec l'endonucléase V du phage T4 qui crée un bris simple

brin en 5' de chaque CPD, alors que l'autre n'est pas traitée. Les échantillons ont été séparés par migration dans un gel dénaturant, suivi d'une analyse par buvardage de type Southern avec une sonde spécifique à une région du locus du type sexuel (Figure 11), ce qui a permis la quantification du pourcentage de réparation pour chaque temps de réparation. Comme le montre la figure 12B, cette approche offre en plus le grand avantage de permettre l'analyse de la réparation des trois régions : les loci *MAT*, *HML* et *HMR*, en une seule expérience.

Dans les cellules de type sauvage, la réparation du locus *MAT*, actif transcriptionnellement, s'effectue de façon rapide par rapport aux loci *HML* et *HMR* qui sont empaquetés dans une forme d'hétérochromatine (Figure 12D). En effet, on trouve en moyenne 20 % de réparation après 1 h pour les loci *HML* et *HMR*, par rapport à 48 % pour le locus *MAT*. Dans le même ordre d'idées, on trouve en moyenne 40 % et 65 % de réparation pour les loci *HML* et *HMR* après 2 h et 4 h, respectivement, par rapport à 71 % et 80 % pour le locus *MAT*, pour les mêmes temps. Globalement, ceci est un élément en faveur du fait que la structure d'hétérochromatine faite par les protéines Sir, ou l'absence de transcription aux loci *HML* et *HMR*, diminue la réparation des dommages créés par les rayons UV dans ces régions. En effet, il est ici impossible de faire la distinction entre l'impact de la structure de l'hétérochromatine et la présence de la transcription étant donné que dans ce système, ces deux éléments sont directement liés.

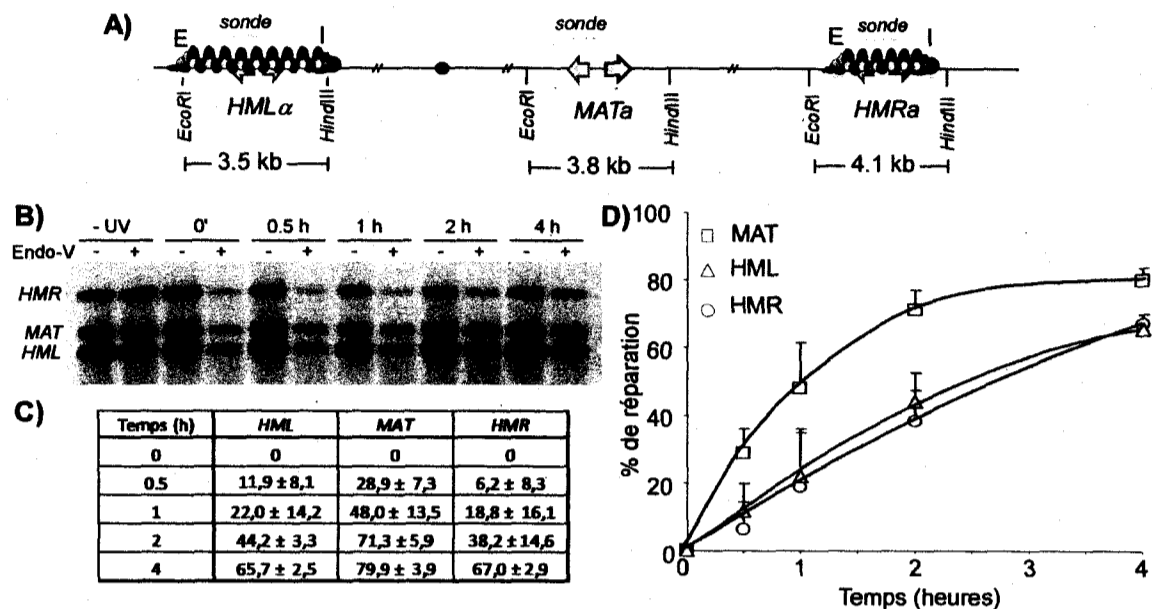


Figure 12 : Analyse de la réparation du locus du type sexuel dans les cellules de type sauvage. (A) Représentation schématique du locus du type sexuel dans des cellules de type sauvage. (B) Buvardage de type Southern après séparation des échantillons sur gel dénaturant. (C) Tableau du pourcentage de réparation. (D) Graphique du pourcentage de réparation en fonction du temps. (C) et (D) représente la moyenne de trois expériences indépendantes et les écarts-types.

4.2.1.2 – Analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel dans les mutants *sir2Δ*

Les mutants *sir2Δ* ont été traités exactement de la même façon que les cellules de type sauvage afin de déterminer la cinétique de réparation de l'ADN du locus du type sexuel. De façon intéressante, on trouve dans les mutants *sir2Δ* une cinétique de réparation similaire pour les trois régions du locus du type sexuel (figure 13D). De fait, après 2 h de réparation dans du milieu frais, on trouve un pourcentage de 68 %, 62 % et 67 % de réparation pour les loci *MAT*, *HML* et *HMR*, respectivement, alors qu'on trouve en moyenne 86 % de réparation pour les trois régions après 4 heures. Par ailleurs, il faut noter que la réparation des loci *HML* et *HMR* dans les mutants *sir2Δ* procède plus rapidement que dans les cellules de type sauvage. En effet, après 2 h, on trouve en

moyenne de 65 % de réparation pour les loci *HML* et *HMR* dans les mutants *sir2Δ* et une moyenne de 41 % dans les cellules de type sauvage, alors qu'on trouve une moyenne de 86 % après 4 h dans les mutants *sir2Δ* et 66 % dans les cellules de type sauvage (figure 13E). De plus, dans les mutants *sir2Δ*, on trouve une cinétique de réparation des loci *HML* et *HMR* similaire à la réparation du locus *MAT*, qui est aussi comparable avec la réparation du locus *MAT* dans les cellules de type sauvage (figure 13D et E). En résumé, la perte du gène *SIR2*, qui empêche la formation de l'hétérochromatine et relève l'inhibition transcriptionnelle aux loci *HML* et *HMR*, engendre une uniformisation de la cinétique de réparation des trois régions du locus du type sexuel, où la cinétique de réparation des loci *HML* et *HMR* se retrouve accélérée et très semblable à la cinétique de

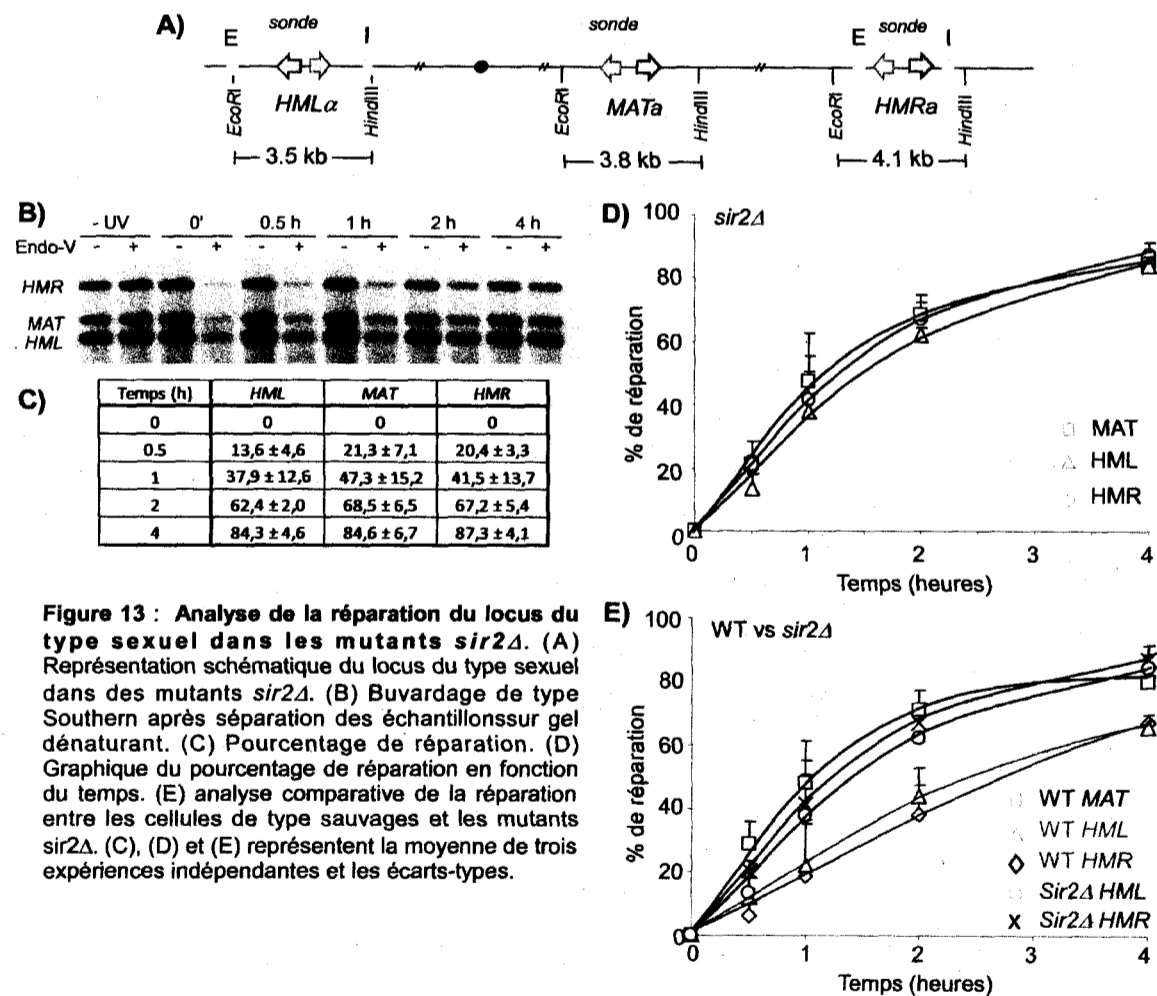


Figure 13 : Analyse de la réparation du locus du type sexuel dans les mutants *sir2Δ*. (A) Représentation schématique du locus du type sexuel dans des mutants *sir2Δ*. (B) Buvardage de type Southern après séparation des échantillons sur gel dénaturant. (C) Pourcentage de réparation. (D) Graphique du pourcentage de réparation en fonction du temps. (E) analyse comparative de la réparation entre les cellules de type sauvages et les mutants *sir2Δ*. (C), (D) et (E) représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et les écarts-types.

réparation du locus *MAT* dans les cellules de type sauvage. Cependant, encore une fois cette expérience ne permet pas de discriminer entre l'importance de l'hétérochromatine par rapport au rôle de la réparation couplée à la transcription comme agent responsable de l'activation de la réparation.

4.2.1.3 – Analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel dans les mutants *sir3Δ*

Les mutants *sir3Δ* ont été traités et analysés tel que décrit précédemment pour les cellules de type sauvage. Globalement, la cinétique de réparation du locus *MAT* semblerait être légèrement plus rapide par rapport à la réparation des loci *HML* et *HMR* dans les mutants *sir3Δ* : après 1 h d'incubation dans du milieu frais, on trouve 42 % de réparation pour le locus *MAT*, alors que les loci *HML* et *HMR* sont réparés à 27 % et 25 %, respectivement.

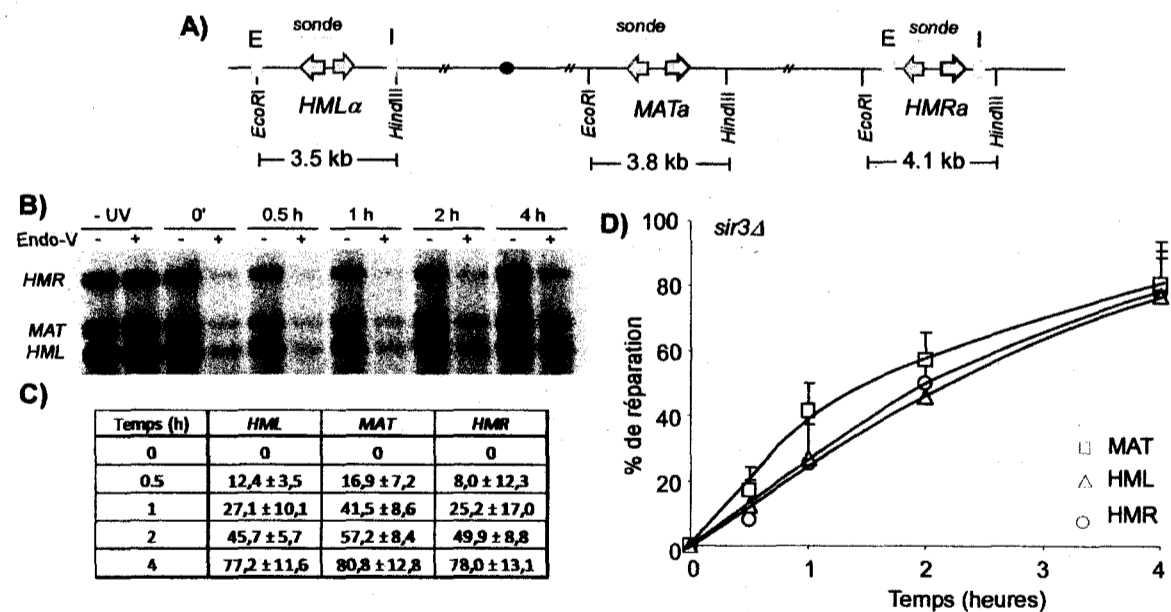


Figure 14 : Analyse de la réparation du locus du type sexuel dans les mutants *sir3Δ*. (A) Représentation schématique du locus du type sexuel dans des cellules *sir3Δ*. (B) Buvardage de type Southern après séparation des échantillons sur gel dénaturant. (C) pourcentage de réparation. (D) Graphique du pourcentage de réparation en fonction du temps. (C) et (D) représente la moyenne de trois expériences indépendantes et les écarts-types.

De plus, après 2 h, on trouve 57 % de réparation pour le locus *MAT* par rapport à 46 % et 50 % pour les loci *HML* et *HMR*, respectivement. Cependant, cette tendance est complètement perdue après 4 h de réparation où l'on trouve en moyenne près de 80 % de réparation pour les trois loci (figure 14D). Il est intéressant de remarquer que les loci *HML* et *HMR* sont réparés avec une cinétique similaire dans les mutants *sir3Δ*.

Pour permettre une analyse complète, il est intéressant de comparer la cinétique de réparation du locus du type sexuel obtenu dans les mutants *sir3Δ* avec les cellules de type sauvage et les mutants *sir2Δ*. Quoique légèrement inférieure après 2 h d'incubation dans du milieu frais, on trouve globalement une réparation du locus *MAT* similaire dans les mutants *sir3Δ* à ce que l'on trouve dans des cellules de type sauvage et des mutants *sir2Δ* (figure 15A). En effet, après 2 h dans du milieu frais, on trouve 57 % de réparation dans les mutants *sir3Δ*, alors qu'on trouvait 71 % pour les cellules de type sauvage, et 69 % pour les mutants *sir2Δ*. Après 4 h d'incubation dans du milieu frais, on trouve en moyenne 82 % de réparation pour les trois souches. De façon surprenante, la réparation obtenue pour les loci *HML* et *HMR* dans les mutants *sir3Δ* (en moyenne 48 % à 2 h et 78

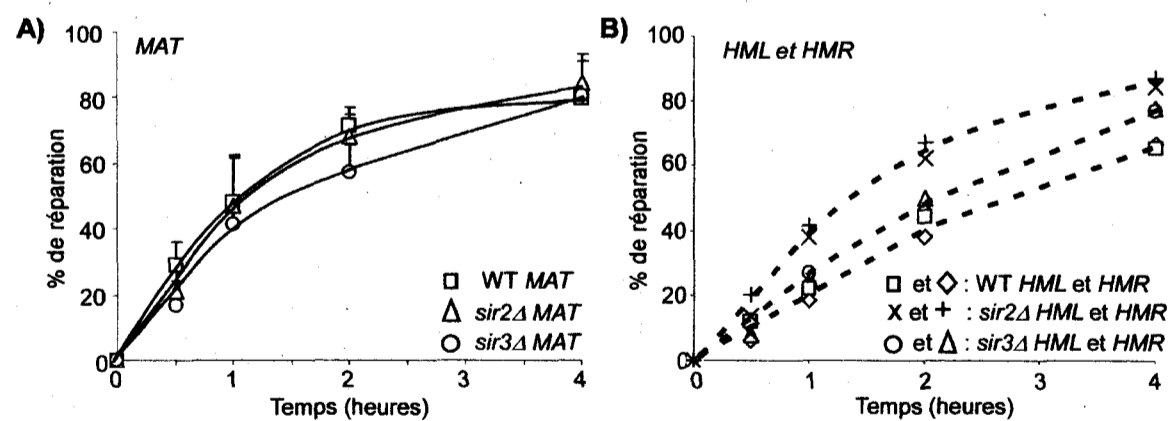


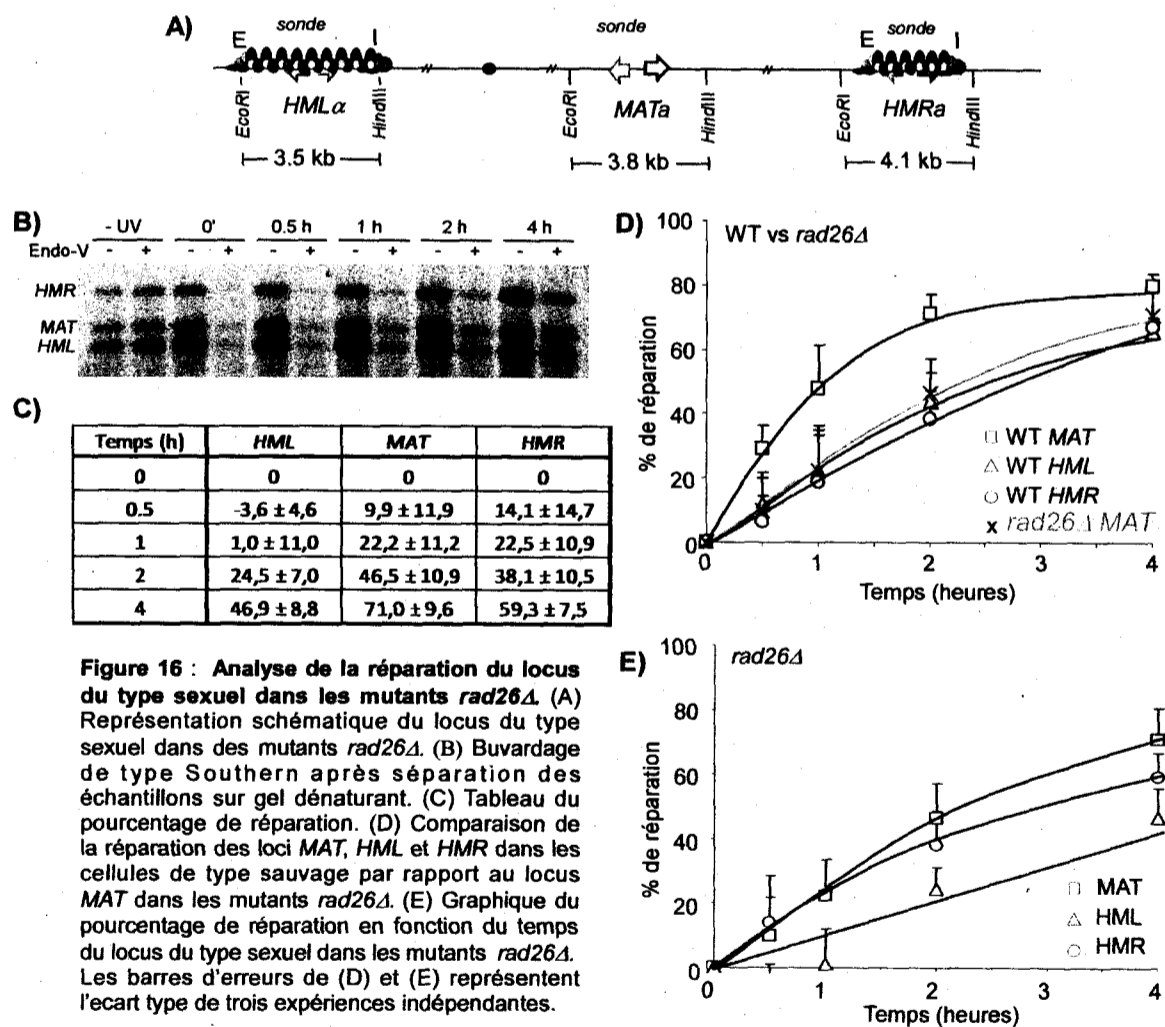
Figure 15 : Comparaison de la cinétique de réparation du locus du type sexuel dans les cellules de type sauvage par rapport aux mutants *sir2Δ* et *sir3Δ*. (A) Comparaison de la réparation du locus *MAT*, les barres d'erreurs représentent l'écart-type de trois expériences indépendantes. (B) Comparaison de la réparation des loci *HML* et *HMR*. Pour éviter de charger le graphique les barres d'erreurs ne sont pas présentées.

% à 4 h) semble intermédiaire entre la cinétique trouvée pour les loci *HML* et *HMR* dans les cellules de type sauvage (en moyenne 41 % à 2 h et 66 % à 4 h) et dans les mutants *sir2Δ* (en moyenne 65 % à 2 h et 86 % à 4 h) (figure 15B). À partir de ces expériences, on peut conclure que la réparation des loci *HML* et *HMR* dans les mutants *sir3Δ* semble plus rapide que dans les cellules de type sauvage. Cependant, bien que la délétion du gène *SIR2* ou *SIR3* a en principe le même effet sur les loci *HML* et *HMR* en terme d'ouverture de la chromatine (RINE et HERSKOWITZ, 1987), la réparation des loci *HML* et *HMR* dans les mutants *sir3Δ* n'atteint pas le niveau de ce qui est obtenu dans les mutants *sir2Δ*, où l'on trouve une réparation équivalente des loci *HML* et *HMR* par rapport au locus *MAT*. Ainsi, ces résultats indiqueraient qu'il y a possiblement une activation supplémentaire de la réparation dans les mutants *sir2Δ* par rapport aux mutants *sir3Δ*, qui serait potentiellement indépendante de l'ouverture de l'hétérochromatine aux loci *HML* et *HMR*.

4.2.1.4 – Analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel dans les mutants *rad26Δ*

À l'image des cellules de type sauvage et des mutants *sir2Δ* et *sir3Δ*, les mutants *rad26Δ* ont été irradiés et remis en culture dans du milieu frais pour réparation tel que décrit précédemment. De façon intéressante, on trouve une cinétique de réparation ralentie pour le locus *MAT* par rapport aux cellules de type sauvage : après 2 h de réparation, on trouve 47 % de réparation dans les mutants *rad26Δ* par rapport à 71 % dans les cellules de type sauvage, alors qu'on trouve 71 % après 4 h dans les mutants *rad26Δ* par rapport à 80 %

dans les cellules de type sauvage (Figure 16 D). Il est important de rappeler que le produit du gène *RAD26* est impliqué dans la réparation couplée à la transcription, et que ce mécanisme est affecté dans les mutants *rad26Δ* (VAN GOOL *et al.*, 1994). En ce qui concerne le locus *HMR*, on trouve une cinétique de réparation similaire à ce qui a été décrit pour le locus *MAT* pour ce mutant (figure 16E). Par contre, et de façon inexplicée, la cinétique de réparation trouvée pour le locus *HML* est d'autant plus ralentie chez le mutants *rad26Δ* (figure 16E). En effet, on trouve 25 % de réparation après 2 h d'incubation, et 47 % après 4h. En somme, malgré que le locus *MAT* possède une chromatine sous forme permissive à la transcription dans les mutants *rad26Δ*, on y trouve



une réparation diminuée, équivalente à la réparation trouvée pour les loci *HML* et *HMR* dans des cellules de type sauvage (Figure 16D). Ceci ajoute un élément au fait que, à tout le moins dans le cas des mutants *rad26* Δ , la structure euchromatique au locus *MAT* n'ait pas une influence majeure quant à la facilité d'accès à l'ADN pour la machinerie de réparation par rapport aux loci *HML* et *HMR*, mais qu'il s'agirait plutôt de la réparation couplée à la transcription qui jouerait le rôle de premier déterminant pour permettre une réparation efficace de l'ADN. En effet, malgré la forme euchromatique au locus *MAT*, on trouve une réparation diminuée en absence de *RAD26*, une protéine impliquée dans la réparation couplée à la transcription (VAN GOOL *et al.*, 1994).

4.2.2 – Analyse de la cinétique de réparation des dommages créés par les UV dans un fragment télomérique

Afin de poursuivre l'analyse de l'impact de l'hétérochromatine sur la réparation des dommages créés par les UV, et par le fait même mettre à l'épreuve les hypothèses tirées à partir de l'étude de la réparation du locus du type sexuel, nous avons procédé à l'étude de la cinétique de réparation de l'ADN télomérique. La levure *Saccharomyces cerevisiae* possède 16 chromosomes (donc 32 télomères). Parmi ceux-ci, 17 télomères sont considérés comme des télomères Y', en référence à une séquence d'ADN nommé « Y' » contenue dans ces télomères (LOUIS et HABER, 1990; LOUIS et HABER, 1992). Tel que discuté précédemment, les protéines Sir2p, sir3p et Sir4p font parties des facteurs impliqués dans la formation de l'hétérochromatine télomérique (LIEW et NORBURY, 2009), et sont présentes en quantité décroissante à partir de l'extrémité des télomères vers

l'intérieur des chromosomes, où l'on trouve à 2,8 kb des extrémités environ 20 % de la quantité des protéines présentes à 0,5 kb (figure 5F) (STRAHL-BOLSINGER *et al.*, 1997). Il est connu que la délétion des gènes *SIR* ouvre l'hétérochromatine des télomères et relève l'inhibition transcriptionnelle télomérique (APARICIO *et al.*, 1991). Ainsi, l'analyse de la cinétique de réparation des CPD présentes dans les télomères dans les cellules de type sauvage, en comparaison avec les mutants *sir2Δ* et *sir3Δ*, constitue aussi un système pertinent pour étudier l'impact de l'hétérochromatine sur la réparation des dommages créés par les UV.

4.2.2.1 – Analyse de la cinétique de réparation des dommages créés par les UV dans un fragment télomérique terminal de ~3kb.

Cette analyse procède exactement de la même façon que décrit précédemment pour le locus du type sexuel, à l'exception des enzymes de restriction et de la sonde. Dans le cas de l'analyse de la réparation des télomères, nous avons utilisé les enzymes *HindIII* ou *XhoI*, et une sonde qui cible les séquences Y' (figure 11E). Lors de l'analyse de la réparation d'un fragment télomérique terminal de ~3 kb libéré par l'enzyme *HindIII*, nous trouvons dans les cellules de type sauvage 49 % de réparation après 2 h et 71 % après 4 h (figure 17C). De façon intéressante, on trouve une cinétique de réparation similaire lors de l'analyse de la réparation du même fragment télomérique dans les mutants *sir2Δ* et *sir3Δ*. En effet, on trouve une réparation de 50 % et 54 % après 2 h d'incubation, et de 84 % et

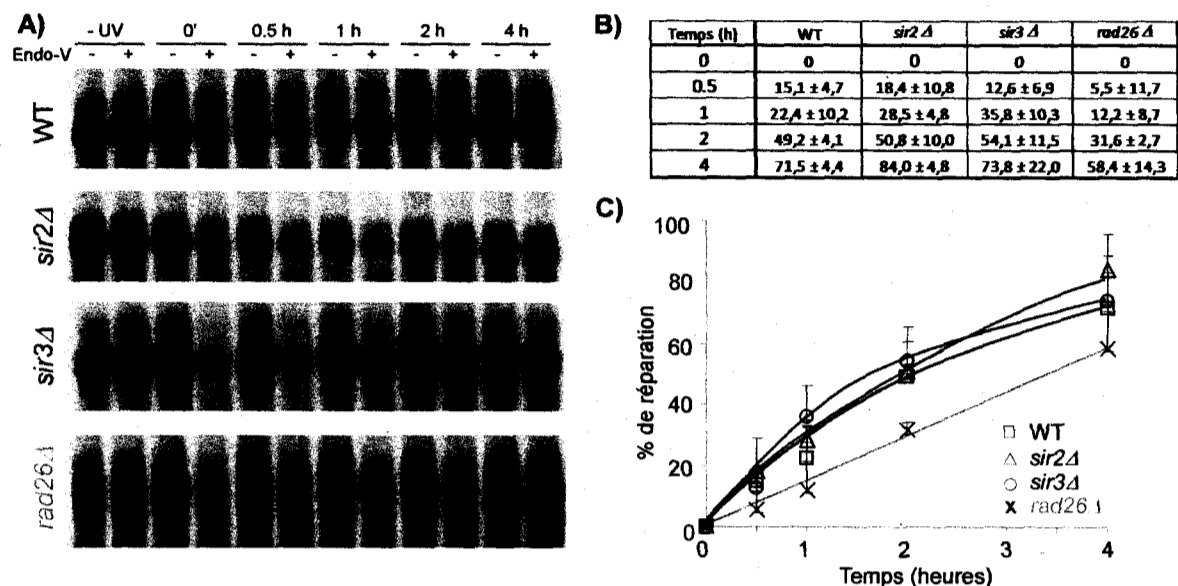


Figure 17 : Analyse de la réparation d'un fragment télomérique de 3 kb. (A) Buvardage de type Southern avec une sonde Y' révélant le fragment terminal de restriction (TRF) de 3 kb à la suite de la digestion avec l'enzyme de restriction *Hind*III pour les cellules de type sauvage, les mutants *sir2Δ*, *sir3Δ* et *rad26Δ*. (B) pourcentage de réparation. (C) Graphique du pourcentage de réparation en fonction du temps de la réparation du TRF de 3 kb. Les barres d'erreurs représentent l'écart type d'au moins trois expériences indépendantes.

74 % après 4 h de réparation, pour le fragment terminal dans les mutants *sir2Δ* et *sir3Δ*, respectivement. (figure 17C). Selon Strahl-Bolsinger *et al.*, les protéines Sir couvrent, en quantité décroissante, toute la longueur du fragment que nous analysons (figure 5F) (STRAHL-BOLSINGER *et al.*, 1997). Ainsi, ce résultat nous indique que la perte de l'hétérochromatine télomérique entraînées par la perte des gènes *SIR* n'a pas d'effet sur la réparation des CPD contenus dans les télomères.

En parallèle, nous avons effectué l'analyse de la cinétique de réparation des télomères des mutants *rad26Δ*, dans lesquels la TC-NER est affectée (VAN GOOL *et al.*, 1994). De façon surprenante, on trouve que la réparation des télomères s'effectue plus lentement dans ces mutants par rapport aux cellules de type sauvage et par conséquent aux mutants *sir2Δ* et *sir3Δ* (figure 17C). En effet, on trouve une réparation de 32 % après 2 h et 58 % après 4 h pour le fragment terminal de ~3 kb, ce qui correspond à une diminution de près

de 20 % de réparation après 2 h par rapport aux cellules de type sauvage. Ceci est un indice que la réparation couplée à la transcription dépendante de *RAD26* jouerait un rôle déterminant dans la réparation de l'ADN sous télomérique, alors que la présence d'hétérochromatine formée par les protéines Sir ne semblerait pas affecter la réparation.

4.2.2.2 – Analyse de la cinétique de réparation des dommages créés par les UV le long des extrémités télomériques

Dans le but d'obtenir davantage d'informations sur le mécanisme de réparation des CPD qui sont présents dans les télomères, nous avons procédé à une analyse de la cinétique de réparation le long de l'extrémité des chromosomes. Pour ce faire, nous avons comparé la

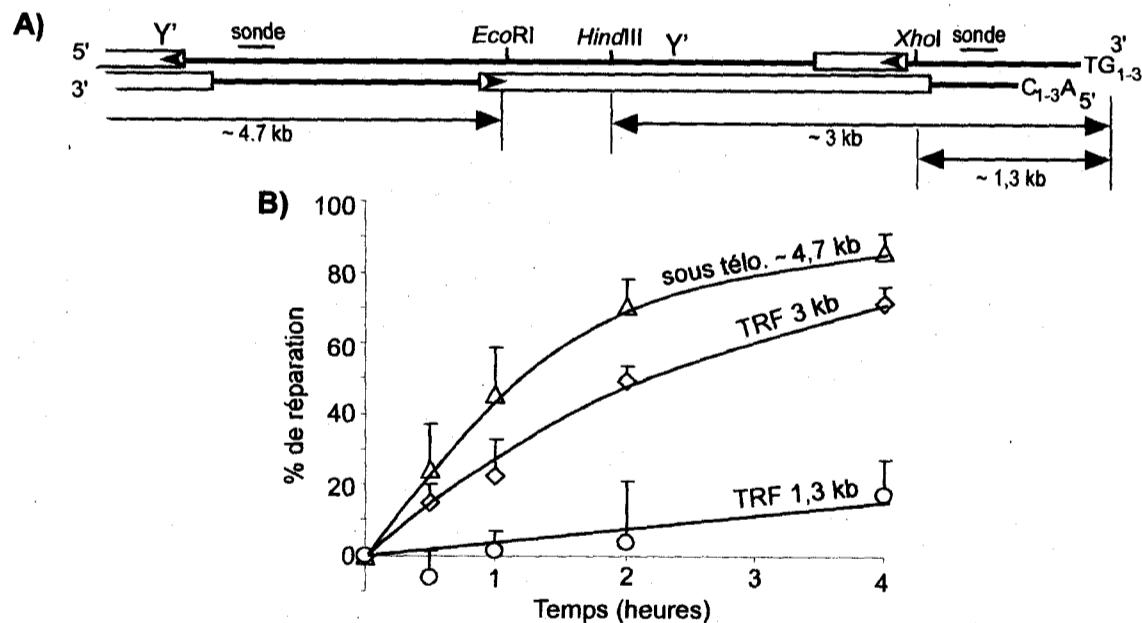


Figure 18 : Analyse de la réparation le long des extrémités télomériques. (A) Représentation schématique d'un télomère. Les boîtes grises font références aux séquences Y', les boîtes rouges font références à un gène qui serait transcrit sur le brin C-riche, alors que les boîtes bleues font références à un gène qui serait transcrit sur le brin G-riche, mais dont l'existence reste à confirmer. La sonde est un fragment d'ADN double brin produit par PCR (B) Graphique du pourcentage de réparation en fonction du temps de la réparation du TRF de 1,3 kb par digestion avec l'enzyme de restriction *XhoI*, en comparaison avec un TRF de 3 kb par digestion avec *HindIII* et du fragment sous télomériques d'environ 4,7 kb par digestion *EcoRI* et *HindIII*. Les barres d'erreurs de représentent l'écart-type d'au moins trois expériences indépendantes.

cinétique de réparation dans trois régions des extrémités des télomères, à savoir un groupe de fragments sous télomériques de ~4,7 kb libérés par la combinaison d'enzymes *EcoRI* et *HindIII*, un fragment télomérique terminal de ~3 kb libéré par l'enzyme *HindIII* et un fragment télomérique terminal de ~1,3 kb libéré par *XhoI* (figure 18A). À noter que le fragment de ~1,3 kb fait partie intégrante du fragment de ~3 kb, ainsi que des fragments de ~4,7 kb, mais il nous permet une image de la réparation plus terminale sur les chromosomes, où les protéines Sir sont présentes en plus grande quantité (Figure 5F) (STRAHL-BOLSINGER *et al.*, 1997). On identifie que la cinétique de réparation est fonction de la position par rapport à l'extrémité des chromosomes, où plus on approche de l'extrémité, plus la réparation s'effectue lentement. En effet, après 1 h d'incubation dans du milieu frais, on trouve 46 %, 22 %, et 1,3 % de réparation pour le fragment sous télomérique de ~4,7 kb, le fragment télomérique terminal de ~3 kb et le fragment télomérique terminal de ~1,3 kb, respectivement. Dans le même ordre, on trouve une réparation décroissante de 70 %, 49 % et 3,6 % de réparation après 2 h, et 86 %, 71 %, et 17 %, après 4 h (figure 18B).

4.2.2.3 – Analyse différentielle de la réparation des deux brins de l'ADN télomérique

Afin de vérifier l'implication de la réparation couplée à la transcription dans la réparation de l'ADN télomérique, nous avons procédé à l'analyse de la réparation d'un brin de l'ADN télomérique en comparaison avec l'autre brin, dans le fragment terminal de 3 kb. À cette fin, la même procédure d'irradiation, d'extraction et de traitement de l'ADN est empruntée, à l'exception de la sonde utilisée lors du buvardage de type Southern. En effet,

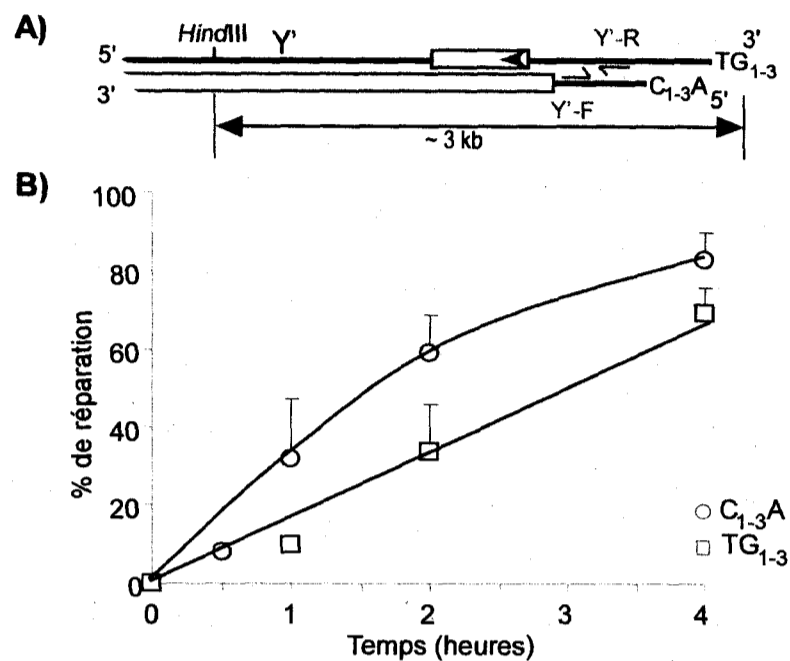


Figure 19 : Analyse différentielle de la réparation des deux brins d'un fragment télomérique de 3 kb dans des cellules de type sauvage. (A) Représentation schématique d'un télomère Y', avec les sonde Y'-F et Y'-R en vert. Les boîtes de couleurs sont tel que décrit dans la figure 18 (B) pourcentage de réparation du brin C₁₋₃A et TG₁₋₃.

il s'agit dans le cas présent d'utiliser une paire d'oligonucléotides simple-brin spécifiques à un brin ou l'autre de l'ADN dont on veut analyser la cinétique de réparation. Ainsi, la sonde Y'-F permet l'analyse de la cinétique de réparation du brin C₁₋₃A, alors que la sonde Y'-R révèle la réparation du brin TG₁₋₃ (figure 19A). Des résultats préliminaires (incluant deux expériences indépendantes d'irradiation) montrent que le fragment terminal de ~3 kb du brin C₁₋₃A est réparé plus rapidement que le brin TG₁₋₃ (figure 19B). En effet, après 2 h d'incubation dans du milieu frais, on trouve 59 % de réparation pour le brin C₁₋₃A et 33 % pour le brin TG₁₋₃, de même que 83 % pour le brin C₁₋₃A et 69 % pour le brin TG₁₋₃ après 4 h d'incubation. Ces expériences préliminaires démontrèrent qu'une portion terminale de 3 kb du brin C₁₋₃A est réparée plus rapidement que le brin opposé TG₁₋₃, et suppose la présence de réparation couplée à la transcription dans les régions sous-télomériques, où des gènes sont présents (voir discussion pour plus de détails).

5 – Discussion

Deux objectifs principaux ont guidés les présents travaux. Le premier était d'identifier des gènes impliqués dans la modification de la chromatine et qui influencent la réparation des dommages créés par les UV, et de caractériser le rôle de ceux-ci. L'hypothèse posée stipule que la perte d'un gène impliqué dans l'ouverture de la chromatine pour faciliter la réparation des CPD rendrait celle-ci plus compacte et limiterait l'accès à l'ADN à la machinerie de réparation rendant ainsi les cellules plus sensibles aux rayons UV. À l'inverse, la perte d'un gène impliqué dans la fermeture de la chromatine laisserait celle-ci plus ouverte, facilitant ainsi l'accès aux dommages par la machinerie de réparation. Les cellules sans ce gène seraient par conséquent plus résistantes aux rayons UV. Le deuxième objectif de ces travaux proposait d'étudier, sur le plan moléculaire, l'effet de l'hétérochromatine sur la réparation des dommages créés dans les UV.

5.1 – Criblage pour identifier des gènes affectant légèrement la survie des cellules irradiées aux rayons UV

La plupart des méthodes populaires pour détecter la sensibilité de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à des agents chimiques ou physiques endommageant l'ADN sont basées sur le dénombrement de colonies sur milieu solide. Cette approche permet de compter sur une boîte de pétri le nombre de colonies, ce qui reflètent directement le nombre de cellules qui ont survécues à un traitement donné. Ces méthodes ont permis l'identification d'une panoplie de gènes impliqués dans divers mécanismes de réparation

de l'ADN. Bien que très utile, cette approche montre un désavantage important par son manque de sensibilité. En effet, avec ces méthodes, il est difficile d'identifier quel serait l'effet de faible dose d'agents endommageant l'ADN sur des cellules. Dans la même ligne d'idées, ces méthodes ne permettent pas d'identifier des gènes qui seraient impliqués indirectement dans un mécanisme de réparation. Ces deux situations affectent soit le taux de croissance des cellules traitées (vitesse de division cellulaire moyenne dans une population), ou le temps nécessaire à la récupération de la croissance des cellules, ou les deux, sans toutefois changer le nombre de cellules qui survivent au traitement en tant que tel. Dans le cas de cette étude, nous désirons cribler de façon dirigée une librairie de souches de levures pour identifier des gènes impliqués dans la modification de la chromatine, qui affecteraient positivement ou négativement l'efficacité de réparation des dommages créés par les UV. Ceci aurait pour effet de modifier de quelques heures seulement le temps nécessaire à la réparation, sans toutefois affecter la survie cellulaire directement. Pour détecter ce type de différences subtiles dans le phénotype, il faudrait en fait suivre la vitesse à laquelle se forment les colonies sur milieu solide après une irradiation aux UV. Bien qu'envisageable, cette façon de procéder s'avère techniquement fastidieuse et peu quantifiable. À l'inverse, le suivi de la croissance des cellules en milieu liquide par lecture d'absorbance du milieu de culture offre toutes les possibilités techniques répondants à ces besoins.

5.1.1 – Suivi de la croissance des cellules en milieu liquide

Le suivi de la croissance en milieu liquide présente aussi des difficultés techniques, principalement l'importante charge de travail requise pour effectuer les lectures d'absorbance pendant plusieurs heures afin d'établir une courbe de croissance. Cependant, nous avons utilisé une approche semi-automatisée qui nous a permis de contourner cette difficulté. En effet, nous avons adopté une méthode de suivi de la croissance en micro-culture de 100 μ l par lecture de l'absorbance automatisée grâce à un lecteur de plaque multi-puits. Le lecteur de plaques permet non seulement une lecture de l'absorbance à toutes les 10 minutes, et ce, pendant le temps voulu, mais assure aussi l'incubation et l'agitation du milieu de culture tout au long de l'analyse. Ainsi, le test se résume désormais à placer les cellules traitées en culture et laisser les lectures procéder le temps voulu. Il en résulte une série de points constituant une courbe de croissance. Une courbe de croissance est divisée en trois phases; 1- la phase de latence (nommée λ), 2- une phase exponentielle de croissance, et 3- une phase plateau où la croissance cesse (figure 1, publication no.1) (ZWIETERING *et al.*, 1990). Pour certains microorganismes, la phase plateau est suivie par une phase de décroissance correspondant à la mortalité des cellules qui manquent de nutriments et d'espace. La phase de latence correspond au temps requis pour que la population atteigne sa vitesse de croissance maximale, qui est en principe, dans notre cas, directement proportionnel au temps nécessaire pour réparer l'ADN à la suite d'un traitement par des agents endommageant l'ADN. Par ailleurs, nous avons élaboré un algorithme mathématique qui permet l'analyse des courbes de croissance. Cet algorithme nous fournit des paramètres chiffrés décrivant la croissance tels que le temps de latence « λ », et le taux de croissance maximale « μ_m » (figure 1, publication no.1). Il devient donc facile de comparer objectivement et statistiquement la récupération ainsi que

la croissance des cellules après un traitement donné. Ainsi, il serait possible avec cette méthode en milieu liquide d'identifier des mutants qui auraient une vitesse de croissance ou de récupération qui sont affectées positivement ou négativement après un traitement quelconque. La méthode complète est décrite sous forme de protocole détaillé dans la revue Nature Protocols (TOUSSAINT et CONCONI, 2006).

5.1.2 – Mise au point et validation de la méthode pour l'analyse de la sensibilité des cellules de levure *S. cerevisiae* aux rayons UV

La validation de la méthode, et la mise au point des conditions à utiliser ont été effectuées à l'aide de trois agents endommageant l'ADN qui crée différents types de dommages, et qui par conséquent font appels à différents mécanismes de réparation de l'ADN. Il s'agit du méthyl méthanesulfonate (MMS), la bléomycine (BLM) et les rayons UV. De plus, afin de valider l'essai, nous avons utilisé des souches contrôles dont la sensibilité à ces agents est connue.

Le MMS est un agent alkylant qui modifie les bases guanines en 7-méthylguanine, et les bases adénines en 3-méthyladenine, causant un mésappariement des bases et un arrêt de la fourche de réplication, respectivement (BERANEK, 1990; LUNDIN *et al.*, 2005). Bien que le mécanisme de réparation des dommages créés par le MMS demeure un sujet de recherche en soit, il est connu que les mutants *rad9* Δ et *rad17* Δ montrent une sensibilité accrue à l'agent chimique par rapport aux cellules de type sauvage (LUNDIN *et al.*, 2005; SCHIESTL *et al.*, 1989). Ceux-ci sont impliqués dans le mécanisme de point de contrôle

assurant l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation (revue dans NYBERG *et al.*, 2002). Dans le même ordre d'idées, les mutants *rad52Δ*, impliqués dans la recombinaison homologue (KROGH et SYMINGTON, 2004), montrent aussi une sensibilité au MMS par rapport aux cellules de type sauvage (LUNDIN *et al.*, 2005; SCHIESTL *et al.*, 1989). Ces souches ont été utilisées pour la validation et la mise au point de la méthode de suivi de croissance en milieu liquide, dans des conditions d'expositions chroniques et aiguës au MMS. De fait, cette analyse a permis de démontrer que le suivi de croissance en milieu liquide est apte à détecter une sensibilité des cellules, et ce, à des doses beaucoup plus faibles que le dénombrement de colonies sur milieu solide (figure 2 et 3, publication no.1). De plus, le suivi de la croissance en milieu liquide nous permet d'obtenir de l'information sur le taux de croissance ainsi que le temps de latence, lorsque les cellules sont traitées avant, ou pendant le suivi de la croissance.

La bléomycine est un agent antitumoral radiomimétique qui en présence de certains cofacteurs cause des bris simple brin et double brins dans la double hélice d'ADN par une attaque dirigée contre le pentose du squelette de l'ADN impliquant des radicaux libres (POVIRK, 1996). Encore une fois, les mutants *rad9Δ*, *rad17Δ* et *rad52Δ* possèdent une sensibilité attendue à la bléomycine (KROGH et SYMINGTON, 2004; NYBERG *et al.*, 2002; RAMOTAR et WANG, 2003). Ceux-ci ont été utilisés pour la validation de la méthode de suivi de croissance en milieu liquide, dans des conditions d'expositions chroniques à l'agent chimique. Tout comme lors de l'utilisation du MMS, ces souches ont permis de démontrer que la méthode à l'étude montre une plus grande sensibilité alors qu'on détecte une différence dans la croissance des cellules à des doses inférieures par

rapport aux doses nécessaires pour le dénombrement de colonies sur milieu solide. De fait, aucun effet n'est observé aux doses utilisées pour les mutants *rad9Δ* et *rad17Δ* avec la méthode sur milieu solide, alors que le suivi de la croissance en milieu liquide nous montre clairement une différence dans la croissance des cellules (figure 4, publication no.1).

Finalement, nous avons mis à l'épreuve la méthode de suivi de croissance en milieu liquide en utilisant les rayons UV comme source de dommage à l'ADN. Pour ce faire, nous avons sélectionné des souches avec des niveaux différents de sensibilité, à savoir les mutants *rad1Δ*, étant très sensibles, les mutants *rad7Δ* et *rad16Δ*, montrant une sensibilité intermédiaire, et les mutants *rad26Δ* (PRAKASH et PRAKASH, 2000). Il est connu que la protéine encodée par le gène *RAD26* est impliquée dans la réparation couplée à la transcription, mais personne n'avait identifié auparavant une sensibilité aux rayons UV du mutant de délétion *rad26Δ* (VAN GOOL *et al.*, 1994). Encore une fois, la méthode de suivi de croissance en milieu liquide s'est montrée apte à détecter un effet sur la récupération des cellules à une dose plus faible que ce que permet la méthode classique de dénombrement de colonies sur milieu solide. En effet, on trouve un impact sur la récupération des mutants *rad7Δ* et *rad16Δ* et *rad26Δ* à 20 J/m², ce qui est impossible de détecter par la croissance sur milieu solide (figure 5, publication no.1). Par ailleurs, l'utilisation de cette méthode a permis de démontrer que le mutant *rad26Δ* est bel et bien sensible aux rayons ultraviolets (figure 5, publication no.1). Finalement, il est intéressant de noter que les protéines Rad7p et Rad16p agissent sous forme de complexe (YU *et al.*,

2004), et que nous identifions ici une sensibilité aux rayons UV similaire pour ces deux mutants.

La méthode de suivi de la croissance en milieu liquide s'avère donc hautement sensible par rapport à la méthode classique sur milieu solide pour détecter la sensibilité de différentes souches de levure à un agent endommageant l'ADN. De plus, à l'aide d'un algorithme, cette méthode permet d'obtenir des paramètres mathématiques décrivant les courbes de croissance, rendant l'analyse de la sensibilité des cellules plus quantitatives. Finalement, cette approche est facilement applicable à des études de criblage haut débit.

5.1.3 – Criblage dirigé pour identifier des gènes impliqués dans la modification de la chromatine affectant la récupération des levures *S. cerevisiae* après irradiation aux rayons UV

À la suite de cette validation, nous avons procédé au criblage de mutants de délétion à partir de la banque de mutants disponible contenant tous les mutants de délétion des gènes non essentiels (WINZELER *et al.*, 1999). Selon l'intérêt du laboratoire, nous avons ciblé un groupe de gènes ayant un rôle dans la modification de la chromatine tel que des histones acétyl transférases (HAT) et les histones déacétylases (HDAC), qui pourraient affecter positivement ou négativement la réparation des dommages créés par les UV (SMERDON et CONCONI, 1999). Dans l'éventualité où un gène encodant une HAT est important pour aider la réparation des CPD, son absence rendrait le mutant de délétion correspondant plus sensible aux rayons UV, potentiellement dû au fait que la machinerie

de réparation aurait plus difficilement accès à l'ADN pour effectuer son travail. À l'inverse, si un gène encodant une HDAC à une influence sur la réparation des CPD, le mutant de délétion correspondant serait plus résistant aux rayons UV, du fait que la chromatine serait constamment plus accessible dans ces mutants.

Parmi les huit mutants testés correspondant à des gènes encodant une HAT (*gcn5Δ*, *hat1Δ*, *hat2Δ*, *sas2Δ*, *sas3Δ*, *elp3Δ*, *nut1Δ*, et *spt10Δ*.) et les 12 mutants correspondant à des gènes encodant une HDAC (*hda1Δ*, *sir2Δ*, *hos1Δ*, *hos2Δ*, *hos3Δ*, *hst1Δ*, *hst2Δ*, *hst3Δ*, *hst4Δ*, *hpa2Δ*, *hpa3Δ* et *rpd3Δ*), nous avons identifié deux souches plus sensibles aux rayons UV, soit *gcn5Δ* et *spt10Δ*, et deux souches ayant une vitesse de récupération plus rapide, donc plus résistante, que la souche de type sauvage, soit *sir2Δ* et *rpd3Δ* (figure 6, publication no.1). Ces résultats sont en lien avec les hypothèses posées, à savoir que la perte d'un gène encodant une HAT qui influencerait la NER devrait rendre les cellules plus sensibles aux rayons UV, et à l'inverse, la perte d'un gène encodant une HDAC qui influencerait aussi la NER devrait rendre les cellules plus résistantes aux UV. Cependant, il n'est pas possible de tirer directement à partir de ces résultats des conclusions quant à l'implication de ces gènes dans le mécanisme de réparation des dommages créés par les UV. En effet, il est primordial de pousser la caractérisation du phénotype de chacun de ces mutants afin de confirmer les hypothèses précédentes.

L'un des intérêts principal du laboratoire se porte sur l'influence des structures hétérochromatiques sur la réparation des dommages créés par les UV. Ainsi, la découverte du mutant *sir2Δ* démontrant une résistance accrue aux rayons UV s'est avérée fort

intéressante pour nous, et nous avons choisi de pousser davantage la caractérisation de ce dernier. En effet, chez la levure *S. cerevisiae*, le gène *SIR2* encode une histone déacétylase dont l'activité est très importante dans plusieurs processus dont le vieillissement, la formation de la chromatine répressive de l'ADN ribosomal, des télomères et du locus du type sexuel, et la répression de la transcription par l'ARN polymérase II de plusieurs promoteurs (BLANDER et GUARENTE, 2004; MARMORSTEIN, 2004). De plus, l'homologue du gène *SIR2* dans plusieurs organismes, dont l'humain, est aussi impliqué, entre autres, dans le vieillissement (BLANDER et GUARENTE, 2004). Ainsi, la caractérisation du rôle des gènes *GCN5* et *SPT10* et *RPD3* dans la modification de la résistance des mutants de délétions aux rayons UV a été mise en attente au profit de la caractérisation du rôle du gène *SIR2*, jugée prioritaire selon nos intérêts.

5.2 – Caractérisation du phénotype des mutants *sir2Δ* après irradiation aux rayons UV

Tel que mentionné précédemment, la protéine Sir2p joue un rôle important dans les cellules, notamment dans la construction de l'hétérochromatine des télomères et du locus du type sexuel (BLANDER et GUARENTE, 2004; HABER, 1998; LUSTIG, 1998; OTTAVIANI *et al.*, 2008). Ainsi, trois hypothèses, mutuellement non-exclusives, pourraient expliquer pourquoi les mutants *sir2Δ* récupèrent plus rapidement par rapport aux cellules de type sauvage après irradiation aux rayons UV : 1- l'abolition du gène *SIR2* relève l'inhibition transcriptionnelle faite par la protéine, et permet l'expression des gènes « *MATa* » et « *MATa* » contenus aux loci *HML* et *HMR*, respectivement (HABER, 1998),

créant un état de pseudo-diploïdie dans ces mutants. Des travaux ont démontré l'impact d'un changement du statut du type sexuel sur les capacités de réparation de l'ADN (ASTROM *et al.*, 1999; FASULLO *et al.*, 1999; FASULLO et DAVE, 1994; FRIIS et ROMAN, 1968; HEUDE et FABRE, 1993; HOPPER *et al.*, 1975; KEGEL *et al.*, 2001; KUNZ et HAYNES, 1981; LEE *et al.*, 1999; LEMONTT, 1980; LIVI et MACKAY, 1980; MORTIMER, 1958). Il est donc envisageable que le phénotype du mutant *sir2Δ* après irradiation aux rayons UV soit un effet indirect de l'expression simultanée des gènes « *MATa* » et « *MATa* », qui modifient de façon globale le patron de transcription d'une cellule; 2- la perte de l'hétérochromatine aux loci *HML* et *HMR*, de même qu'aux télomères, pourrait faciliter l'accès pour la machinerie de réparation aux dommages présents dans ces régions permettant une réparation plus efficace, ce qui rendrait les cellules plus résistantes; et 3- des données ont montré que les protéines Sir2p, Sir3p et Sir4p pourraient potentiellement être impliquées directement dans la réparation de l'ADN, dont les cassures d'ADN double brins, en étant déplacées des télomères vers les cassures d'ADN double brins. (MARTIN *et al.*, 1999; MILLS *et al.*, 1999; TAMBURINI et TYLER, 2005), et dans la NHEJ (LEE *et al.*, 1999). Il faut donc considérer la possibilité que la protéine Sir2p joue elle-même un rôle, direct ou indirect, dans la réparation des dommages créés par les UV.

5.2.1 – Tous les mutants *sirΔ* récupèrent plus rapidement que les cellules de type sauvage après une irradiation aux rayons UV

Le gène *SIR2* fait partie d'une famille de gènes appelée SIR (*Silent Information Regulator*), qui contient quatre membres; *SIR1*, *SIR2*, *SIR3* et *SIR4* (MOAZED et al., 2004). Les protéines encodées par ces quatre gènes sont toutes impliquées dans la formation de l'hétérochromatine du locus du type sexuel. De ce groupe, trois membres, soit les gènes *SIR2*, *SIR3* et *SIR4*, sont impliqués dans la formation de l'hétérochromatine des télomères, alors que seul le gène *SIR2* est impliqué dans la répression transcriptionnelle identifiée au locus de l'ADN ribosomal (MOAZED et al., 2004). Ainsi, il était important de vérifier en premier lieu si le phénotype identifié pour le mutant de délétion *sir2* Δ après irradiation aux rayons UV est spécifique à celui-ci, ou plutôt spécifique à la famille entière des gènes SIR. De fait, nous avons démontré que non seulement les mutants *sir2* Δ , mais aussi les mutants *sir1* Δ , *sir3* Δ et *sir4* Δ , récupèrent plus rapidement après une irradiation aux rayons UV par rapport aux cellules de type sauvage, et ce, de façon similaire entre eux (figure 1, publication no.2).

5.2.2 – L'effet de ploïdie est responsable de la récupération plus rapide des mutants *sir* Δ par rapport aux cellules de type sauvage après irradiation aux rayons UV

La perte des quatre gènes SIR provoque l'expression des gènes « *MATa* » et « *MATa* », et induit un état de pseudo-diploïdie dans la cellule (HABER, 1998). Afin de tester la première hypothèse, soit l'implication du phénomène de pseudo-diploïdie dans la résistance des mutants *sir* Δ aux rayons UV, nous avons utilisé trois approches différentes. Premièrement, nous avons vérifié la sensibilité de mutants *sir* Δ dans lesquels les promoteurs des gènes *MATa* et *MATa* ont été inactivés. Ces derniers n'expriment donc

aucune protéine contrôlant le type sexuel, et se comportent par conséquent comme des cellules haploïdes de type sexuel « a » (figure 3). Cette façon de faire nous a permis de démontrer que malgré l'absence des gènes *SIR*, les cellules qui n'expriment ni le gène *MAT α* , ni le gène *MATa*, récupèrent de façon très similaire par rapport aux cellules de type sauvage (figure 2A, publication no.2). Deuxièmement, nous avons utilisé une souche pseudo-haploïde . Il s'agit d'une souche diploïde, qui contient deux jeux de chromosomes, mais qui n'expriment aucun type sexuel et se comporte par conséquent comme une cellule haploïde « a ». Nous avons démontré que cette souche récupère plus lentement par rapport à une souche diploïde (figure 2B, publication no.2). Finalement, nous avons utilisé une souche diploïde homozygote *sir2 Δ /sir2 Δ* , et démontré que cette dernière récupère de façon similaire à une cellule de type sauvage diploïde (figure 2C, publication no.2). En somme, notre première hypothèse s'avère être la plus probable. En effet, nos résultats ont démontré que le phénotype des mutants *sir Δ* est en fait une conséquence du statut du type sexuel des cellules. Ainsi, une cellule exprimant les gènes « *MAT α* » et « *MATa* » est plus résistante qu'une cellule exprimant aucun ou un seul type sexuel, et ce, sans égard à la présence des gènes *SIR*. En d'autres mots, une cellule se comportant comme une cellule diploïde (pseudo-diploïde) est plus résistante par rapport à une cellule se comportant comme une cellule haploïde, et ce, peu importe le nombre réelle de jeux de chromosomes. De plus, l'analyse d'un mutant diploïde homozygote *sir2 Δ /sir2 Δ* montre bien que l'absence du gène *SIR2* n'a aucun effet sur la sensibilité des cellules, confirmant que ce dernier ne serait pas impliqué directement dans la réparation des dommages créés par les rayons UV. Par conséquent, il devient inutile à ce point ci de tester plus en profondeur les deux autres hypothèses qui auraient pu expliquer la résistance des mutants *sir Δ* .

5.2.3 – La recombinaison homologue est responsable de la récupération plus rapide des mutants *sir* Δ par rapport aux cellules de type sauvage après irradiation aux rayons UV

Il est connu que l'hétérozygotie au locus du type sexuel rend les cellules plus résistantes à certains agents endommageant l'ADN, et augmente globalement la recombinaison homologue (FASULLO *et al.*, 1999; FASULLO et DAVE, 1994; FRIIS et ROMAN, 1968; HEUDE et FABRE, 1993; HOPPER *et al.*, 1975; KUNZ et HAYNES, 1981; LEE *et al.*, 1999; LEMONTT, 1980; LIVI et MACKAY, 1980; MORTIMER, 1958). Afin de vérifier l'implication de la recombinaison homologue dans le phénotype des mutants *sir* Δ après irradiation aux rayons UV, nous avons fait le suivi de la croissance en milieu liquide de mutants de délétion de gènes impliqués dans la recombinaison homologue, en combinaison avec la délétion des gènes *SIR*. Nous avons démontré que la délétion d'un gène essentiel à la recombinaison homologue tel que *RAD52*, *RAD54* ou *RAD57*, en combinaison dans un mutant *sir* Δ , abolit la récupération plus rapide de ces derniers (figure 3, publication no.2). Ainsi, en absence de la recombinaison homologue, il y a perte du phénotype de résistance des mutants *sir* Δ . En parallèle, nous avons vérifié l'implication de la réparation couplée à la transcription dans ce phénotype en vérifiant comment les doubles mutants *sir* Δ *rad26* Δ se comportent après irradiation aux UV par rapport au simple mutant *rad26* Δ et aux cellules de type sauvage. Dans ce cas, nous avons démontré que le gène *RAD26* ne serait pas impliqué dans la récupération plus rapide des mutants *sir* Δ . En effet, le phénotype est toujours présent malgré l'absence du gène. Étant donné la grande sensibilité des mutants du groupe I et du groupe II de la NER, et que le phénotype

de résistance des mutants *sirΔ* est visible seulement à 150 J/m² (Figure 6 papier 1, et donnée non montrée), il n'a pas été possible avec cette approche de vérifier l'implication d'autres gènes de la NER au-delà du gène *RAD26*. En résumé, ces résultats démontrent que la recombinaison homologe est nécessaire dans des mutants *sirΔ* haploïdes pour permettre une récupération plus rapide après irradiation aux rayons UV.

5.2.4 – Les cellules en phase G2/M du cycle cellulaire récupèrent plus rapidement après une irradiation aux rayons UV, de façon dépendante de la recombinaison homologe et la NER.

Pour assurer la réparation d'une molécule d'ADN endommagée, la recombinaison homologe utilise une deuxième copie de chromosome homologue dans les cellules diploïdes, ou la chromatide sœur en phase G2/M du cycle cellulaire dans une cellule haploïde (KROGH et SYMINGTON, 2004; SAN FILIPPO *et al.*, 2008). Ainsi, nous avons vérifié comment se comporte une culture de cellules synchronisées en phase G2/M du cycle cellulaire après irradiation aux rayons UV, par rapport à des cellules non-synchronisées et des cellules synchronisées en phase G1. De façon intéressante, nous avons démontré que les cellules en phase G2/M du cycle cellulaire sont en fait plus résistantes aux rayons UV par rapport aux cellules non-synchronisées, alors que les cellules synchronisées en phase G1 du cycle cellulaire montrent une sensibilité encore supérieure (figure 4, publication no.2). De façon consistante avec le résultat obtenu précédemment pour la récupération plus rapide des mutants *sirΔ*, nous avons démontré que la recombinaison homologe serait impliquée en phase G2/M du cycle cellulaire afin

de permettre une récupération plus rapide de ces cellules. De fait, l'abolition de la recombinaison homologue élimine la résistance des cellules synchronisées en phase G2/M du cycle cellulaire (figure 5, publication no.2). De plus, nous avons démontré que les gènes *RAD7* et *RAD16*, impliqués dans la GG-NER (YU *et al.*, 2004), sont tous deux aussi impliqués dans la récupération accélérée des cellules synchronisées en phase G2/M du cycle cellulaire, puisque les simples mutants *rad7Δ* et *rad16Δ* ne récupèrent pas plus rapidement lorsque irradiés en G2/M. Fait à remarquer, ce phénotype de résistance des cellules en phase G2/M est toujours présent dans les mutants *rad26Δ* et *rad34Δ* démontrant que la TC-NER ne serait pas impliquée dans ce phénotype (figure 5, publication no.2).

Ceci démontrerait une co-participation de la recombinaison homologue et de la NER durant la phase G2/M du cycle cellulaire pour la récupération rapide des cellules irradiées aux UV. Afin d'analyser l'importance relative de la NER par rapport à la recombinaison homologue dans une culture de cellules non synchronisées, nous avons procédé à l'analyse détaillée de la sensibilité aux rayons UV de différents mutants impliqués dans la NER et de la recombinaison homologue. Ceci nous a permis de confirmer l'implication de la recombinaison homologue, mais aussi de démontrer, tel qu'attendu, que la réparation par excision de nucléotide joue en fait un rôle plus important pour la récupération des cellules après irradiation aux UV (figure 6, publication no.2).

5.2.5 – Interaction de la NER et la recombinaison homologue en phase G2/M du cycle cellulaire pour permettre une réparation efficace des dommages créés par les UV; un modèle.

Ces résultats génétiques sont en fait insuffisants pour établir un mécanisme moléculaire précis décrivant l'interaction de la NER avec la recombinaison homologue, qui permettrait la réparation des dommages créés par les UV en phase G2/M du cycle cellulaire. Voici néanmoins certaines hypothèses qui couvrent tous les résultats obtenus, selon l'état des connaissances actuelles de la littérature. Dans l'ensemble du cycle cellulaire, les dommages créés par les rayons UV sont reconnus et réparés par la machinerie de la réparation par excision de nucléotide. Ainsi, les mutants de la NER des gènes de classe I sont très sensibles aux UV. Cependant, lorsqu'un dommage est présent en phase G2/M du cycle cellulaire, de nouvelles possibilités s'offriraient aux cellules pour assurer une réparation plus efficace. La machinerie de la NER permettrait la reconnaissance du dommage et débiter la réparation. Ceci créerait une section d'ADN simple brin à la suite de l'excision de l'oligonucléotide contenant le dommage. Les résultats obtenus proposent que la recombinaison homologue serait aussi impliquée dans la réparation des dommages créés par les UV durant la phase G2/M du cycle cellulaire. Ceci, potentiellement afin de réparer la portion d'ADN simple brin laissée par l'excision de l'oligonucléotide contenant le dommage. À ce titre, il est connu que la protéine Rad1p, coresponsable avec Rad10p de l'incision en 5' du dommage, est impliquée à la fois dans la NER grâce à une interaction physique avec Rad14p, et dans la recombinaison homologue (GUZDER *et al.*, 2006). On pourrait donc imaginer que Rad1p pourrait agir

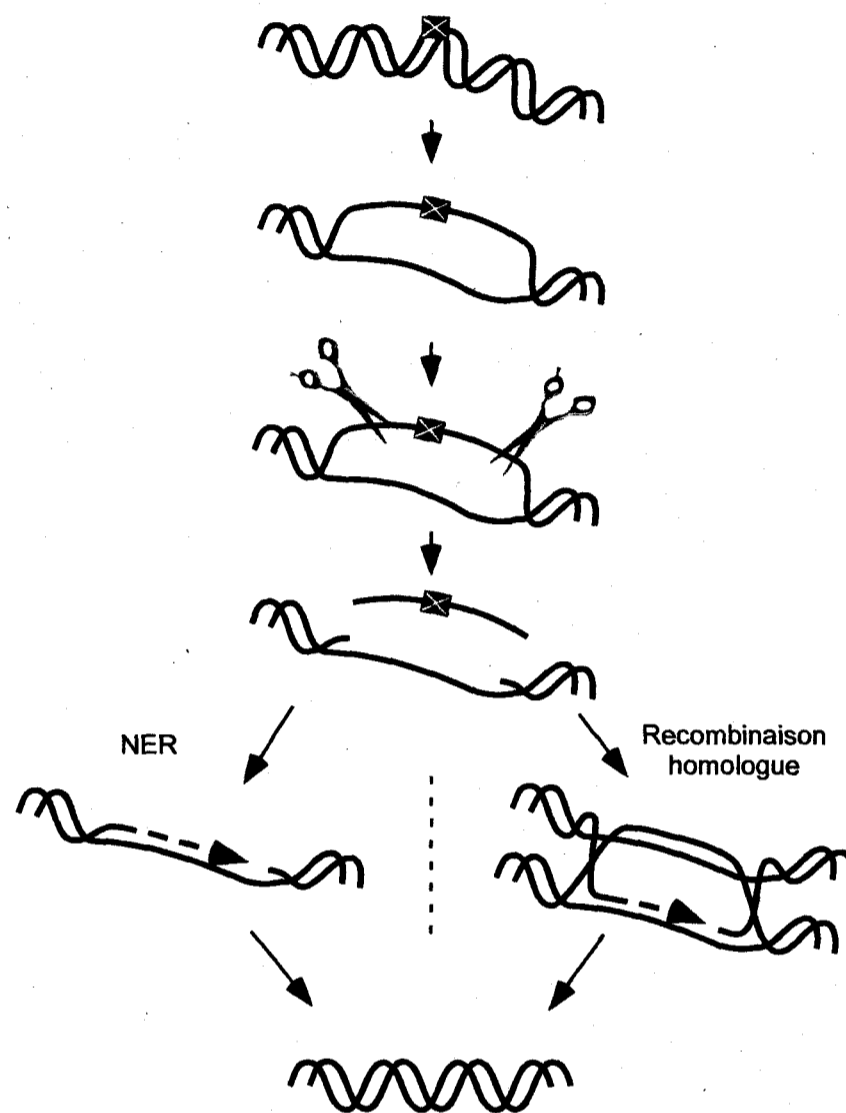


Figure 20 : Modèle résumant les résultats. En phase G2/M du cycle cellulaire, la réparation des CPD est initiée par la NER. Par la suite, deux mécanismes, la NER et la recombinaison homologue, peuvent agir sur la molécule d'ADN qui présente une portion d'ADN simple brin, afin d'assurer une réparation rapide et efficace.

comme intermédiaire entre la NER et la recombinaison homologue durant la phase G2/M du cycle cellulaire, potentiellement à travers des interactions protéines à protéines entre Rad1p et des protéines de la recombinaison homologue, facilitant l'implication de ce mécanisme pour la réparation de la portion d'ADN simple brin laissé par la NER. En résumé, en phase G2/M du cycle cellulaire, la NER initierait la réparation. Par la suite,

deux mécanismes, soit la NER et la recombinaison homologue, pourraient compléter la réparation afin de corriger le dommage le plus rapidement possible et assurer une meilleure survie pour la cellule (figure 20).

5.3 – Étude de l'impact de l'hétérochromatine sur la réparation des dommages créés par les rayons UV

Il est clairement accepté dans la littérature que la présence du nucléosome et de la chromatine en général inhibe la réparation des CPD par la NER (SMERDON et CONCONI, 1999; TREMBLAY *et al.*, 2009). De plus, il a été démontré que l'augmentation de la répression transcriptionnelle aux locus *HML* par mutation d'une histone inhibent davantage la NER (CHAUDHURI *et al.*, 2009), et que la réparation du gène *URA3* intégré dans les régions sous-télomériques se voit aussi diminué (LIVINGSTONE-ZATCHEJ *et al.*, 2003). Le but du deuxième objectif de cette étude est en fait d'analyser si la présence de l'hétérochromatine faite par les protéines Sir, tel qu'on les retrouve en situation normale *in vivo*, diminue davantage la réparation des dommages créés par les rayons UV, par rapport à l'inhibition naturelle offerte par les nucléosomes. De façon intéressante, ce deuxième objectif constitue une suite logique du début des travaux. En effet, bien qu'il apparaisse qu'une interaction entre la recombinaison homologue et la NER serait responsable de la récupération plus rapide de mutants *sirΔ* après une irradiation aux rayons UV, cela ne permet pas de conclure quoique ce soit en ce qui a trait à la réparation, sur le plan moléculaire, des régions hétérochromatiques telles que le locus du type sexuel et les télomères. En effet, il demeure possible que ces régions

soient plus accessibles, et donc réparées plus rapidement en absence des protéines Sir. Ceci constitue l'élément du deuxième objectif de cette étude, c'est à dire : est-ce que l'hétérochromatine formée par les protéines Sir inhibe la réparation des dommages créés par les UV?

Pour répondre à cette question, nous avons procédé à l'analyse de la cinétique de réparation de l'ADN présent au locus du type sexuel ainsi qu'aux télomères. Le locus du type sexuel constitue un choix stratégique, puisqu'il présente trois régions très semblables quant à la séquence de l'ADN qui possède la particularité de présenter deux structures de chromatine différentes. En effet, le locus *MAT* est sous forme de chromatine permissive et par conséquent transcriptionnellement actif, alors que les loci *HML* et *HMR* sont empaquetés sous une forme hétérochromatique (transcriptionnellement silencieuse) dont les protéines Sir sont au cœur (figure 4A). Ces trois régions du génome offrent donc la possibilité de comparer, *in vivo*, l'impact d'une structure hétérochromatique sur une même séquence d'ADN, et ce, avec deux approches différentes : 1- en comparant la réparation aux loci *HML* et *HMR* avec la réparation du locus *MAT* dans des cellules de type sauvage, et 2- en comparant la réparation aux loci *HML* et *HMR* dans des cellules de type sauvage par rapport à des mutants *sirΔ*. Par ailleurs, l'analyse de la cinétique de réparation des télomères dans des cellules de type sauvage par rapport aux mutants *sirΔ* permet aussi l'étude de l'impact d'une structure hétérochromatique sur la réparation des dommages créés par les rayons UV.

5.3.1 – Analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel

L'analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel dans les cellules de type sauvage et les mutants *sir* Δ nous a permis de tirer différentes conclusions intéressantes. Premièrement, dans des cellules de type sauvage nous avons trouvé que le locus *MAT* est réparé plus rapidement par rapport aux loci *HML* et *HMR* (figure 12). Ceci corrèle avec les résultats de Terleth *et al.* qui rapporte aussi une réparation plus efficace au locus *MAT* par rapport au locus *HML* (TERLETH *et al.*, 1990; TERLETH *et al.*, 1989). Cependant, il est impossible à partir de ces résultats de déterminer ce qui explique cette réparation plus active, à savoir s'il s'agit : 1- de la transcription au locus *MAT* qui permet une TC-NER active; 2- de l'accès de la machinerie de réparation plus facile au locus *MAT* par rapport aux loci *HML* et *HMR* qui sont sous formes hétérochromatiques; ou 3- une combinaison des deux effets.

Dans les mutants *sir2* Δ , on trouve une uniformisation de la cinétique de réparation. En effet, les loci *HML* et *HMR* sont réparés à la même vitesse que le locus *MAT* (figure 13D), lequel est réparé de façon similaire dans les cellules de type sauvage. Ce résultat corrèle avec la recherche faite par Chaudhuri *et al.*, qui rapporte une activation de la réparation du locus *HML* dans les mutants *sir2* Δ par rapport au locus *HML* dans les cellules de type sauvage (CHAUDHURI *et al.*, 2009). Par contre, encore une fois, il n'est pas possible de déterminer si la réparation plus efficace est due : 1- à la transcription (TC-NER) aux loci *HML* et *HMR* qui est rendue possible par l'absence de l'hétérochromatine dépendante de

Sir2p; 2- s'il s'agit de l'ouverture de l'hétérochromatine en tant que tel qui permettrait un meilleur accès à la machinerie de réparation; ou 3- une combinaison des deux effets.

De façon inattendue, on trouve une cinétique de réparation intermédiaire pour le locus du type sexuel dans les mutants *sir3Δ*. En effet, on voit une augmentation de la réparation des loci *HML* et *HMR* par rapport aux cellules de type sauvage, mais cette augmentation est légèrement inférieure à ce qui est trouvé dans les mutants *sir2Δ* (figure 15B). Par ailleurs, après 2 h d'incubation dans du milieu frais, on note une légère diminution de la réparation du locus *MAT* dans les mutants *sir3Δ* par rapport aux cellules de type sauvage (figure 15A). Cependant, il n'est pas possible de conclure à partir de ces résultats que la cinétique de réparation du locus *MAT* dans les mutants *sir3Δ* est clairement différente de ce qui est trouvé dans les cellules de type sauvage. Considérant que les loci *HML* et *HMR* montrent en principe une chromatine ouverte dans les mutants *sir2Δ* et *sir3Δ* (RINE et HERSKOWITZ, 1987), on peut déduire qu'un élément supplémentaire serait présent dans les mutants *sir2Δ* pour y expliquer la réparation un peu plus efficace. Alternativement, on peut envisager que la structure de l'hétérochromatine des loci *HML* et *HMR* dans les mutants *sir3Δ* serait en fait différente par rapport aux cellules *sir2Δ*. De fait, selon le modèle décrivant l'établissement de l'hétérochromatine des Sir présenté dans l'introduction, la protéine Sir3p serait recrutée sur les histones déacétylées après l'arrivée du complexe Sir2p-Sir4p, ce qui permet des cycles itératifs de recrutement des Sir et déacétylation des histones pour étendre le positionnement des protéines Sir sur une région (figure 4). Ainsi, en absence du gène *SIR3*, il est possible que les premières étapes de construction de l'hétérochromatine réalisées par l'hétérodimère Sir2p-Sir4p soient

possibles, ce qui fournirait une structure d'hétérochromatine partielle qui ne s'étendrait pas le long du locus. Cette hypothèse pourrait expliquer que les loci *HML* et *HMR* soient réparés plus rapidement dans un mutant *sir3Δ* par rapport aux cellules de type sauvage étant donné l'ouverture partielle de l'hétérochromatine, mais moins rapidement que dans les mutants *sir2Δ*, qui eux seraient totalement ouverts étant donné l'incapacité d'établir un début d'hétérochromatine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions en premier lieu faire l'analyse de la cinétique de réparation dans les mutants *sir4Δ*, et comparer les résultats trouvés avec les mutants *sir2Δ* et *sir3Δ*. Si l'hypothèse posée s'avèrerait juste, la cinétique de réparation des mutants *sir4Δ* devrait se rapprocher de ce qui est trouvé dans les mutants *sir2Δ*, puisque les protéines Sir2p et Sir4p agissent, en principe, sous forme de complexe dans la construction de l'hétérochromatine des loci *HML* et *HMR*.

Bien que l'expérience avec les mutants *sir3Δ* puisse ajouter des éléments intéressants sur la compréhension de l'impact de l'hétérochromatine sur la réparation des dommages créés par les UV, cette dernière ne permet pas de tirer de conclusions nettes sur : 1- la responsabilité qu'aurait la transcription versus; 2- l'ouverture de l'hétérochromatine, pour permettre une réparation des loci *MAT*, *HML* et *HMR*. Afin d'étudier cette question à l'aide d'une approche différente, nous avons procédé à l'analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel dans les mutants *rad26Δ*. Il est accepté que ce mutant possède une réparation couplée à la transcription affectée (VAN GOOL *et al.*, 1994), mais une structure de chromatine et d'hétérochromatine en principe intacte aux loci *MAT*, *HML* et *HMR*. De façon intéressante, nous avons démontré que la réparation au locus *MAT* dans les mutants *rad26Δ* est diminuée par rapport aux cellules de type sauvage (figure 16).

Ceci permet de poser l'hypothèse que : 1- la réparation couplée à la transcription dépendante de *RAD26* serait plus importante que; 2- la structure de la chromatine ouverte au locus *MAT*, pour permettre sa réparation plus efficace dans les cellules de type sauvage. Bien qu'aucune donnée nous permette de tirer davantage de conclusions, ceci permet de penser que la TC-NER jouerait potentiellement un rôle important par rapport à l'ouverture de l'hétérochromatine, pour la réparation des loci *HML* et *HMR* dans les mutants *sir2Δ* et *sir3Δ*. Nous reviendrons dans la section 5.3.3 sur les perspectives pouvant répondre à cette question.

5.3.2 – Analyse de la cinétique de réparation des télomères

Afin d'ajouter de l'information et mettre à l'épreuve les hypothèses tirées pour la réparation du locus du type sexuel nous avons procédé à l'analyse de la réparation des dommages créés par les UV dans les régions télomériques. Les protéines Sir, impliquées dans l'établissement de l'hétérochromatine télomérique, sont responsables de la répression transcriptionnelle qu'on appelle le TPE (*telomere positioning effet*) (APARICIO *et al.*, 1991; DE BRUIN *et al.*, 2000; GOTTSCHLING *et al.*, 1990; TALBERT et HENIKOFF, 2006), et s'étendent en quantité décroissante jusqu'à 5 kb de l'extrémité du chromosome vers le centromère. De fait, à 2,8 kb de l'extrémité, on trouve près de 20 % de la quantité de protéines Sir présentes à 0,5 kb (figure 5F) (STRAHL-BOLSINGER *et al.*, 1997). De façon intéressante, nous avons démontré qu'un fragment terminal de 3 kb est réparé de façon similaire dans des cellules de type sauvage par rapport à des mutants *sir2Δ* et *sir3Δ*, alors qu'on trouve une réparation diminuée dans les

mutants *rad26Δ*, lequel possède une réparation couplée à la transcription déficiente (figure 17) (VAN GOOL *et al.*, 1994). Ceci permet de poser l'hypothèse que la réparation couplée à la transcription pourrait faciliter l'ouverture de l'hétérochromatine dans les mutants *sirΔ* et permettre une réparation efficace des CPD des régions sous-télomériques. Nous avons aussi montré qu'une corrélation se dessine entre l'efficacité de réparation et la position sur les télomères. En effet, on trouve que la réparation des CPD s'effectue beaucoup plus lentement vers l'extrémité du chromosome par rapport aux régions sous-télomériques (figure 18), ce qui, à ma connaissance, n'avait jamais été démontré auparavant. Ceci pourrait nous indiquer qu'il existe une structure tridimensionnelle, ou quelconque mécanisme, vers l'extrémité des chromosomes qui y inhiberait la réparation. Les résultats présentés nous indiquent que les protéines Sir ne seraient pas impliquées dans cette inhibition, mais cette hypothèse reste à être vérifiée plus en profondeur.

Afin de valider l'implication de la réparation couplée à la transcription dans la réparation des CPD aux télomères, nous avons procédé à l'analyse différentielle de la réparation du brin G-riche (TG₁₋₃), et du brin C-riche (C₁₋₃A) des télomères à l'aide d'oligonucléotides ciblant un brin ou l'autre des télomères, de fragments télomériques terminaux de 3 kb. Des résultats préliminaires montrent que le brin C-riche serait réparé plus rapidement que le brin G-riche (figure 19). Comme contrôle, il est intéressant de remarquer que la moyenne de la réparation du brin C-riche et du brin G-riche se rapproche du résultat obtenu pour de l'analyse de la réparation des deux brins des télomères des mêmes cellules. De plus, la réparation du brin G-riche est similaire à la réparation trouvée pour les deux brins des télomères des mutants *rad26Δ* (figure 21). Une analyse faite à partir des

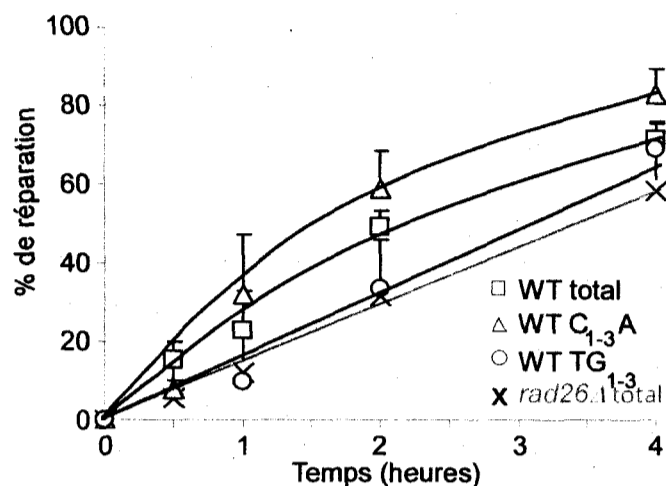


Figure 21 : Comparaison de la cinétique de réparation des CPD dans le brin C-riche et le brin G-riche d'un fragment télomérique terminal de 3 kb dans des cellules de type sauvage par rapport à la réparation des deux brins dans des cellules de type sauvage et des mutants *rad26Δ*.

informations présentes dans une banque de données sur la levure *S. cerevisiae* (www.yeastgenome.org), nous montre que près de 80 % du fragment de 3 kb des télomères Y' analysés contiendrait un gène transcrit sur le brin C-riche, alors que 30 % du fragment contiendrait un gène qui pourrait être transcrit sur le brin G-riche, mais dont l'existence reste à confirmer (figure 22). Ces informations corrélient bien avec les résultats préliminaires obtenus où l'on trouve que le brin C-riche, qui contient un gène potentiellement transcrit, serait réparé plus rapidement que le brin G-riche, qui ne serait peu ou pas transcrit. De plus, la perte de la réparation couplée à la transcription dans les mutants *rad26Δ* diminue la réparation au même niveau que la réparation du brin G-riche, qui ne serait pas transcrit (figure 21).

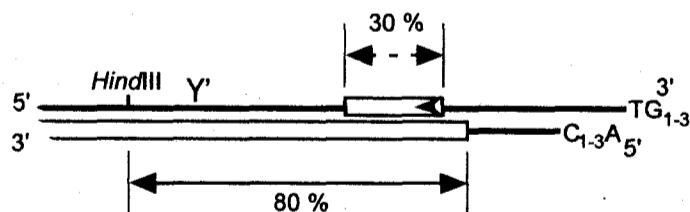


Figure 22 : Pourcentage de transcription potentielle dans un fragment télomérique de 3 kb. Représentation graphique: le brin C-riche (C₁₋₃A), serait transcrit à 80 %, alors que le brin G-riche (TG₁₋₃), pourrait être transcrit à 30 %. L'existence des gènes sur le brin G-riche est cependant incertain.

En résumé, il est connu que la présence des nucléosomes, de même que l'augmentation de la répression aux régions hétérochromatiques, inhibent la réparation des CPD (CHAUDHURI *et al.*, 2009; LIVINGSTONE-ZATCHEJ *et al.*, 2003; SMERDON et CONCONI, 1999). Cependant, l'impact de l'hétérochromatine, telle qu'on la retrouve *in vivo*, sur la réparation des CPD n'a pas été étudié en tant que tel. À ce jour, nos résultats tendent à démontrer que la réparation couplée à la transcription pourrait jouer un rôle important par rapport à l'ouverture de l'hétérochromatine afin de permettre la réparation de l'ADN des régions hétérochromatiques. Cette hypothèse nécessite évidemment plusieurs expériences afin d'être vérifiée, dont voici quelques suggestions.

5.3.3 – Perspectives

Nous proposons ici quelques expériences afin de valider l'hypothèse voulant que la réparation couplée à la transcription jouerait un rôle important par rapport à l'ouverture de l'hétérochromatine afin d'assurer la réparation du locus du type sexuel et des télomères. Premièrement, il sera important de vérifier la réparation du locus du type sexuel dans une cellule de type sauvage dont le promoteur au locus *MAT* est inactivé (ASTROM *et al.*, 1999). Ceci permettra de vérifier directement si la transcription joue un rôle dans la réparation du locus *MAT*, ou dans le cas contraire, si le statut de chromatine accessible au locus *MAT* est suffisant pour permettre une réparation efficace. Dans le même ordre d'idées, il sera possible de faire l'analyse de la réparation du locus *MAT* et des loci *HML* et *HMR* dans des mutants *sir2* Δ et *sir3* Δ dont les promoteurs de tous les gènes *MAT* α et *MAT* α ont été inactivés. Ceci permettra de vérifier à nouveau si l'augmentation de

réparation des loci *HML* et *HMR* identifiée dans ces mutants est causée par : 1- l'activation de la transcription des gènes présents; ou 2- par l'ouverture de l'hétérochromatine de ces régions. Par ailleurs, il sera possible de compléter cette étude par l'analyse de la réparation du locus du type sexuel dans des doubles mutants *sir2Δ rad26Δ*. Dans l'éventualité où l'augmentation de la réparation des loci *HML* et *HMR* trouvée dans les mutants *sir2Δ* soit causée par la réparation couplée à la transcription plutôt que la perte de l'hétérochromatine, ce phénotype devrait être aboli dans un double mutant *sir2Δ rad26Δ*.

Finalement, l'analyse de la réparation des dommages créés par les UV dans un fragment télomérique terminal de 1,3 kb dans des mutants *sir2Δ* et *sir3Δ* permettra de confirmer ou d'infirmier que l'hétérochromatine aux télomères, composée des protéines Sir, n'inhibe pas la réparation des CPD. De plus, il sera très intéressant de corréler plus directement la transcription aux télomères avec l'efficacité de réparation des CPD. À ce titre, Luke *et al.* ont démontré la présence de transcription dans les répétitions télomériques chez la levure *S. cerevisiae* (LUKE *et al.*, 2008). À l'aide d'une approche pour analyser la réparation des CPD au nucléotide près, il serait fort intéressant de vérifier si la présence de cette transcription corrèle avec une réparation accélérée.

6 – Remerciements

La longue aventure de mon doctorat n'aurait pas été possible sans une importante liste de personnes, qui ont été impliqués en contribuant directement ou indirectement à ma réussite. Premièrement, je tiens à remercier sincèrement le Dr Antonio Conconi pour le support inconditionnel qu'il m'a offert. Dans son laboratoire, j'ai pu me développer scientifiquement selon mes intérêts personnels. Les commentaires et la supervision reçue pendant mes études doctorales ont permis, selon mon humble avis, de réussir à ajouter de façon significative aux connaissances dans le domaine de la réparation des dommages créés par les UV, en plus de soulever une quantité importante de questions intéressantes pour la poursuite des travaux. Je voudrais aussi souligner l'implication des Drs Raymund Wellinger et Sherif Abou Elela pour leur disponibilité à répondre à mes questions qui a aidé à guider mes travaux, en plus de contribuer directement à la conduite des expériences par le support en matériels de laboratoire, dont les lecteurs de plaques multi-puits. Je tiens aussi à remercier les membres de mon jury, les Drs Darel Hunting, Benoit Chabot et Dindial Ramotar, pour leur temps et leur intérêt porté à mes travaux.

Je voudrais remercier les membres actuels et passés du laboratoire; Maxime Tremblay, Julie Pelloux, Romain Charton, Geneviève Levasseur, Michel Paquette, Annie D'Amours, Natalie Michaud, Jenna Plamondon et Jonathan Doyon. De fait, une partie des travaux présentés dans ma thèse, soit les expériences pour l'analyse de la cinétique de réparation du locus du type sexuel et une partie des expériences pour l'analyse des télomères, ont été réalisés, sous ma supervision, par Annie D'Amours, Natalie Michaud, Julie Pelloux et

Jonathan Doyon. Il est important d'ajouter que Maxime Tremblay a agit tout au long de ces expériences comme premier conseiller et formateur au niveau technique pour la réalisation des expériences d'analyse de réparation à l'endonucléase V du phage T4. Les deux articles publiés en 2006, soit dans Mutation Research et Nature Protocols, ont été rendus possible grâce à l'implication de Geneviève Levasseur et Julien Gervais-Bird. J'ai eu particulièrement du plaisir à collaborer avec Julien, et mesurer mon cerveau à son intelligence de taille, à travers la mise sur pied de l'algorithme permettant l'analyse des courbes de croissance et l'obtention des paramètres. Dans la réalisation des expériences ayant mené au manuscrit présentement en révision, je voudrais souligner l'implication du Dr Leonid Volkov et le Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel pour le support technique dans l'analyse de la synchronisation des cellules par FACS.

Je tiens aussi à remercier sincèrement le Dr Serge Marchand et toute l'équipe de direction du Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel pour leur appui et le plaisir au travail dans la dernière année. Je tiens particulièrement à remercier Mme Andrée Grenier pour la relecture et la correction du français de ma thèse, et Dr Marchand pour sa grande compréhension durant les mois de rédaction qui m'ont tenu au ralenti intellectuel dans l'exercice de mes fonctions d'adjoint scientifique au directeur du Centre de recherche.

Au-delà de ces relations professionnelles, il est primordial pour moi de souligner l'importance des gens qui ont été près de moi au cours de ces années, et qui ont joué un rôle pivot dans ma réussite. Premièrement, je voudrais dire Merci à ma blonde, Catherine Grenier, pour sa patience, son support et son écoute du petit enfant occasionnel que je

suis. Le bonheur du temps partagé avec elle a facilité sans aucun doute le passage à travers ces étapes finales que sont les dernières expériences, la rédaction d'un manuscrit, et la rédaction de la thèse. Merci et vivement Catherine!!!!

Merci à mes parents Roger et Huguette pour leur support, leur compréhension, et pour la vie en général. Merci à mes frères Éric et Claude, et leur familles respectives, Lorie, Léanne, et les futurs, pour l'intérêt envers mes travaux, et les divertissements. Merci pour les jam party estivaux.

Merci à mes amis Daniel et Alain Desparois, avec qui j'ai pu stimuler mon intellectuel sur la vie, la science, les femmes, et la bière (du moins pendant une période de mon doctorat). Un merci tout spécial à Alain, qui peut-être sans le savoir, à jouer un rôle pivot dans mon choix de poursuivre au doctorat. À travers nos innombrables discussions, Alain a agit comme catalyseur du défi que présentait le doctorat. Parmi mes amis d'enfance, je voudrais aussi remercier Benoit et Bruno Laliberté, pour leurs bons mots et leurs musiques.

Je voudrais aussi dire un merci spécial à mon « nouvel » ami Daniel Laroche, avec qui est né une passion qui a meublé une partie importante de mes loisirs au cours des dernières années, à savoir, la guitare et l'histoire de la guitare Québécoise. En plus des mardi soirs musicaux qui ont permis d'échanger idées, musiques, amitiés, discussions guitares, et création, il est né un projet futur et en cours de rédaction d'un nouvel ouvrage rapportant la passionnante histoire de l'épopée de la construction de la guitare en Estrie

que représente les Guitares Norman. Longue vie et succès à « Acoustic Redgrass Experience ».

Finalement, je voudrais remercier les membres du département pour leurs écoutes attentives, avec des S bien sur, de mes nombreuses, sempiternelles, et répétitives blagues et jeux de mots, dont certaines, je l'avoue bien humblement, étaient douteuses. Merci particulièrement à Jean-François Fisette, qui était en fait un de mes fans numéro un, Simon Lévesque, David Faucher, Timothée Revil et Marie St-Hilaire. À ce groupe de joyeux lurons, j'ajoute tous mes amis d'Ultimate frisbee avec qui j'ai partagé de nombreux soirs et week-end de sport, particulièrement tous les membres des Oranges-Outangs avec qui nous avons eu le bonheur de remporter une ceinture dorée.

À tous et à toutes, et ceux que j'ai oublié, sincèrement MERCI!!!!

7 – Références

- Aboussekhra, A. et Al-Sharif, I. S. "Homologous recombination is involved in transcription-coupled repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J*, Vol: 24(11), P: 1999-2010, 2005.
- Agar, N. S., Halliday, G. M., Barnetson, R. S., Ananthaswamy, H. N., Wheeler, M. et Jones, A. M. "The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 101(14), P: 4954-9, 2004.
- Andressoo, J. O., Hoeijmakers, J. H. et de Waard, H. "Nucleotide excision repair and its connection with cancer and ageing." *Adv Exp Med Biol*, Vol: 570, P: 45-83, 2005.
- Aparicio, O. M., Billington, B. L. et Gottschling, D. E. "Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*." *Cell*, Vol: 66(6), P: 1279-87, 1991.
- Araki, M., Masutani, C., Maekawa, T., Watanabe, Y., Yamada, A., Kusumoto, R., Sakai, D., Sugawara, K., Ohkuma, Y. et Hanaoka, F. "Reconstitution of damage DNA excision reaction from SV40 minichromosomes with purified nucleotide excision repair proteins." *Mutat Res*, Vol: 459(2), P: 147-60, 2000.
- Artandi, S. E. et DePinho, R. A. "Telomeres and telomerase in cancer." *Carcinogenesis*, Vol: 31(1), P: 9-18,
- Astrom, S. U., Okamura, S. M. et Rine, J. "Yeast cell-type regulation of DNA repair." *Nature*, Vol: 397(6717), P: 310, 1999.

- Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khorianti, L., Giulotto, E. et Lingner, J. "Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends." *Science*, Vol: 318(5851), P: 798-801, 2007.
- Becker, M. M. et Wang, Z. "Origin of ultraviolet damage in DNA." *J Mol Biol*, Vol: 210(3), P: 429-38, 1989.
- Beranek, D. T. "Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents." *Mutat Res*, Vol: 231(1), P: 11-30, 1990.
- Blander, G. et Guarente, L. "The Sir2 family of protein deacetylases." *Annu Rev Biochem*, Vol: 73, P: 417-35, 2004.
- Boyce, R. P. et Howard-Flanders, P. "Release of Ultraviolet Light-Induced Thymine Dimers from DNA in E. Coli K-12." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 51, P: 293-300, 1964.
- Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D. et Broach, J. R. "Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation." *Genes Dev*, Vol: 7(4), P: 592-604, 1993.
- Brodeur, J. et Toussaint, M. (2007). Biologie moléculaire: Concepts, techniques et applications. Montréal, CCDMD.
- Brown, D. W., Libertini, L. J., Suquet, C., Small, E. W. et Smerdon, M. J. "Unfolding of nucleosome cores dramatically changes the distribution of ultraviolet photoproducts in DNA." *Biochemistry*, Vol: 32(40), P: 10527-31, 1993.
- Bruhn, L. et Sprague, G. F., Jr. "MCM1 point mutants deficient in expression of alpha-specific genes: residues important for interaction with alpha 1." *Mol Cell Biol*, Vol: 14(4), P: 2534-44, 1994.

- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Morin, B., Raoul, S., Ravanat, J. L. et Spinelli, S. "Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage." *Biol Chem*, Vol: 378(11), P: 1275-86, 1997.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T. et Ravanat, J. L. "Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance." *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, Vol: 131, P: 1-87, 1997.
- Cadet, J., Sage, E. et Douki, T. "Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA." *Mutat Res*, Vol: 571(1-2), P: 3-17, 2005.
- Chakhparonian, M. et Wellinger, R. J. "Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected?" *Trends Genet*, Vol: 19(8), P: 439-46, 2003.
- Chan, C. S. et Tye, B. K. "Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres." *Cell*, Vol: 33(2), P: 563-73, 1983.
- Chaudhuri, S., Wyrick, J. J. et Smerdon, M. J. "Histone H3 Lys79 methylation is required for efficient nucleotide excision repair in a silenced locus of *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res*, Vol: 37(5), P: 1690-700, 2009.
- Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R. E., Hoeijmakers, J. H. et Vermeulen, W. "ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor." *Mol Cell Biol*, Vol: 20(20), P: 7643-53, 2000.
- Clapier, C. R. et Cairns, B. R. "The biology of chromatin remodeling complexes." *Annu Rev Biochem*, Vol: 78, P: 273-304, 2009.
- Clingen, P. H., Arlett, C. F., Roza, L., Mori, T., Nikaido, O. et Green, M. H. "Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts, and

- Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells." *Cancer Res*, Vol: 55(11), P: 2245-8, 1995.
- Conconi, A., Bepalov, V. A. et Smerdon, M. J. "Transcription-coupled repair in RNA polymerase I-transcribed genes of yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 99(2), P: 649-54, 2002.
- Conconi, A., Paquette, M., Fahy, D., Bepalov, V. A. et Smerdon, M. J. "Repair-independent chromatin assembly onto active ribosomal genes in yeast after UV irradiation." *Mol Cell Biol*, Vol: 25(22), P: 9773-83, 2005.
- Courdavault, S., Baudouin, C., Charveron, M., Canguilhem, B., Favier, A., Cadet, J. et Douki, T. "Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations." *DNA Repair (Amst)*, Vol: 4(7), P: 836-44, 2005.
- Craven, R. J. et Petes, T. D. "Involvement of the checkpoint protein Mec1p in silencing of gene expression at telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol*, Vol: 20(7), P: 2378-84, 2000.
- de Bruin, D., Kantrow, S. M., Liberatore, R. A. et Zakian, V. A. "Telomere folding is required for the stable maintenance of telomere position effects in yeast." *Mol Cell Biol*, Vol: 20(21), P: 7991-8000, 2000.
- de Souza-Pinto, N. C., Maynard, S., Hashiguchi, K., Hu, J., Muftuoglu, M. et Bohr, V. A. "The recombination protein RAD52 cooperates with the excision repair protein OGG1 for the repair of oxidative lesions in mammalian cells." *Mol Cell Biol*, Vol: 29(16), P: 4441-54, 2009.

- den Dulk, B., Brandsma, J. A. et Brouwer, J. "The Rad4 homologue YDR314C is essential for strand-specific repair of RNA polymerase I-transcribed rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Microbiol*, Vol: 56(6), P: 1518-26, 2005.
- Denchi, E. L. "Give me a break: how telomeres suppress the DNA damage response." *DNA Repair (Amst)*, Vol: 8(9), P: 1118-26, 2009.
- Douki, T., Court, M., Sauvaigo, S., Odin, F. et Cadet, J. "Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *J Biol Chem*, Vol: 275(16), P: 11678-85, 2000.
- Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J. et Sage, E. "Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation." *Biochemistry*, Vol: 42(30), P: 9221-6, 2003.
- Fabre, F. et Roman, H. "Genetic evidence for inducibility of recombination competence in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 74(4), P: 1667-71, 1977.
- Fasullo, M., Bennett, T. et Dave, P. "Expression of *Saccharomyces cerevisiae* MAT α and MAT α enhances the HO endonuclease-stimulation of chromosomal rearrangements directed by his3 recombinational substrates." *Mutat Res*, Vol: 433(1), P: 33-44, 1999.
- Fasullo, M. et Dave, P. "Mating type regulates the radiation-associated stimulation of reciprocal translocation events in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet*, Vol: 243(1), P: 63-70, 1994.

- Ferreiro, J. A., Powell, N. G., Karabetsou, N., Kent, N. A., Mellor, J. et Waters, R. "Cbf1p modulates chromatin structure, transcription and repair at the *Saccharomyces cerevisiae* MET16 locus." *Nucleic Acids Res*, Vol: 32(5), P: 1617-26, 2004.
- Friis, J. et Roman, H. "The effect of the mating-type alleles on intragenic recombination in yeast." *Genetics*, Vol: 59(1), P: 33-6, 1968.
- Frit, P., Kwon, K., Coin, F., Auriol, J., Dubaele, S., Salles, B. et Egly, J. M. "Transcriptional activators stimulate DNA repair." *Mol Cell*, Vol: 10(6), P: 1391-401, 2002.
- Gaillard, P. H., Martini, E. M., Kaufman, P. D., Stillman, B., Moustacchi, E. et Almouzni, G. "Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I." *Cell*, Vol: 86(6), P: 887-96, 1996.
- Gaillard, P. H., Moggs, J. G., Roche, D. M., Quivy, J. P., Becker, P. B., Wood, R. D. et Almouzni, G. "Initiation and bidirectional propagation of chromatin assembly from a target site for nucleotide excision repair." *EMBO J*, Vol: 16(20), P: 6281-9, 1997.
- Gale, J. M., Nissen, K. A. et Smerdon, M. J. "UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 84(19), P: 6644-8, 1987.
- Gale, J. M. et Smerdon, M. J. "UV-induced pyrimidine dimers and trimethylpsoralen cross-links do not alter chromatin folding in vitro." *Biochemistry*, Vol: 27(19), P: 7197-205, 1988.

- Gale, J. M. et Smerdon, M. J. "UV induced (6-4) photoproducts are distributed differently than cyclobutane dimers in nucleosomes." *Photochem Photobiol*, Vol: 51(4), P: 411-7, 1990.
- Galli, A. et Schiestl, R. H. "On the mechanism of UV and gamma-ray-induced intrachromosomal recombination in yeast cells synchronized in different stages of the cell cycle." *Mol Gen Genet*, Vol: 248(3), P: 301-10, 1995.
- Gangavarapu, V., Prakash, S. et Prakash, L. "Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol*, Vol: 27(21), P: 7758-64, 2007.
- Gartenberg, M. "Heterochromatin and the cohesion of sister chromatids." *Chromosome Res*, Vol: 17(2), P: 229-38, 2009.
- Godschalk, R. W., Maas, L. M., Van Zandwijk, N., van 't Veer, L. J., Breedijk, A., Borm, P. J., Verhaert, J., Kleinjans, J. C. et van Schooten, F. J. "Differences in aromatic-DNA adduct levels between alveolar macrophages and subpopulations of white blood cells from smokers." *Carcinogenesis*, Vol: 19(5), P: 819-25, 1998.
- Gong, F., Fahy, D. et Smerdon, M. J. "Rad4-Rad23 interaction with SWI/SNF links ATP-dependent chromatin remodeling with nucleotide excision repair." *Nat Struct Mol Biol*, Vol: 13(10), P: 902-7, 2006.
- Gong, F., Kwon, Y. et Smerdon, M. J. "Nucleotide excision repair in chromatin and the right of entry." *DNA Repair (Amst)*, Vol: 4(8), P: 884-96, 2005.
- Gottschling, D. E. "Telomere-proximal DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is refractory to methyltransferase activity in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 89(9), P: 4062-5, 1992.

- Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L. et Zakian, V. A. "Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription." *Cell*, Vol: 63(4), P: 751-62, 1990.
- Goutte, C. et Johnson, A. D. "a1 protein alters the DNA binding specificity of alpha 2 repressor." *Cell*, Vol: 52(6), P: 875-82, 1988.
- Green, C. M. et Almouzni, G. "When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics." *EMBO Rep*, Vol: 3(1), P: 28-33, 2002.
- Green, C. M. et Almouzni, G. "Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo." *EMBO J*, Vol: 22(19), P: 5163-74, 2003.
- Grewal, S. I. et Jia, S. "Heterochromatin revisited." *Nat Rev Genet*, Vol: 8(1), P: 35-46, 2007.
- Grompone, G., Sanchez, N., Dusko Ehrlich, S. et Michel, B. "Requirement for RecFOR-mediated recombination in *priA* mutant." *Mol Microbiol*, Vol: 52(2), P: 551-62, 2004.
- Grunstein, M., Hecht, A., Fisher-Adams, G., Wan, J., Mann, R. K., Strahl-Bolsinger, S., Laroche, T. et Gasser, S. "The regulation of euchromatin and heterochromatin by histones in yeast." *J Cell Sci Suppl*, Vol: 19, P: 29-36, 1995.
- Guzder, S. N., Sommers, C. H., Prakash, L. et Prakash, S. "Complex formation with damage recognition protein Rad14 is essential for *Saccharomyces cerevisiae* Rad1-Rad10 nuclease to perform its function in nucleotide excision repair in vivo." *Mol Cell Biol*, Vol: 26(3), P: 1135-41, 2006.

- Haber, J. E. "Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*." *Annu Rev Genet*, Vol: 32, P: 561-99, 1998.
- Hagen, D. C., Bruhn, L., Westby, C. A. et Sprague, G. F., Jr. "Transcription of alpha-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*: DNA sequence requirements for activity of the coregulator alpha 1." *Mol Cell Biol*, Vol: 13(11), P: 6866-75, 1993.
- Hara, R., Mo, J. et Sancar, A. "DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease." *Mol Cell Biol*, Vol: 20(24), P: 9173-81, 2000.
- Hara, R. et Sancar, A. "The SWI/SNF chromatin-remodeling factor stimulates repair by human excision nuclease in the mononucleosome core particle." *Mol Cell Biol*, Vol: 22(19), P: 6779-87, 2002.
- Hara, R. et Sancar, A. "Effect of damage type on stimulation of human excision nuclease by SWI/SNF chromatin remodeling factor." *Mol Cell Biol*, Vol: 23(12), P: 4121-5, 2003.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M. et Grunstein, M. "Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast." *Cell*, Vol: 80(4), P: 583-92, 1995.
- Herschbach, B. M., Arnaud, M. B. et Johnson, A. D. "Transcriptional repression directed by the yeast alpha 2 protein in vitro." *Nature*, Vol: 370(6487), P: 309-11, 1994.
- Heude, M. et Fabre, F. "alpha-control of DNA repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and physiological aspects." *Genetics*, Vol: 133(3), P: 489-98, 1993.
- Hill, D. A. "Influence of linker histone H1 on chromatin remodeling." *Biochem Cell Biol*, Vol: 79(3), P: 317-24, 2001.

- Hill, R. F. "A radiation-sensitive mutant of *Escherichia coli*." *Biochim Biophys Acta*, Vol: 30(3), P: 636-7, 1958.
- Hoeijmakers, J. H. "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature*, Vol: 411(6835), P: 366-74, 2001.
- Hoeijmakers, J. H. "DNA damage, aging, and cancer." *N Engl J Med*, Vol: 361(15), P: 1475-85, 2009.
- Hoppe, G. J., Tanny, J. C., Rudner, A. D., Gerber, S. A., Danaie, S., Gygi, S. P. et Moazed, D. "Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation." *Mol Cell Biol*, Vol: 22(12), P: 4167-80, 2002.
- Hopper, A. K., Kirsch, J. et Hall, B. D. "Mating type and sporulation in yeast. II. Meiosis, recombination, and radiation sensitivity in an alpha-alpha diploid with altered sporulation control." *Genetics*, Vol: 80(1), P: 61-76, 1975.
- Horn, P. J. et Peterson, C. L. "Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription." *Science*, Vol: 297(5588), P: 1824-7, 2002.
- Horowitz, H., Thorburn, P. et Haber, J. E. "Rearrangements of highly polymorphic regions near telomeres of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol*, Vol: 4(11), P: 2509-17, 1984.
- Howard-Flanders, P. et Theriot, L. "A method for selecting radiation-sensitive mutants of *Escherichia coli*." *Genetics*, Vol: 47, P: 1219-24, 1962.
- Huertas, D., Sendra, R. et Munoz, P. "Chromatin dynamics coupled to DNA repair." *Epigenetics*, Vol: 4(1), P: 31-42, 2009.

- Ide, H., Nakano, T., Salem, A. M., Terato, H., Pack, S. P. et Makino, K. "Repair of DNA-protein crosslink damage: coordinated actions of nucleotide excision repair and homologous recombination." *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, Vol: (52), P: 57-8, 2008.
- Ivanov, E. L. et Haber, J. E. "RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol*, Vol: 15(4), P: 2245-51, 1995.
- Jackson, S. P. et Bartek, J. "The DNA-damage response in human biology and disease." *Nature*, Vol: 461(7267), P: 1071-8, 2009.
- Jensen, R., Sprague, G. F., Jr. et Herskowitz, I. "Regulation of yeast mating-type interconversion: feedback control of HO gene expression by the mating-type locus." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 80(10), P: 3035-9, 1983.
- Jiricny, J. "The multifaceted mismatch-repair system." *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol: 7(5), P: 335-46, 2006.
- Kao, Y. T., Saxena, C., Wang, L., Sancar, A. et Zhong, D. "Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 102(45), P: 16128-32, 2005.
- Kappes, U. P., Luo, D., Potter, M., Schulmeister, K. et Runger, T. M. "Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells." *J Invest Dermatol*, Vol: 126(3), P: 667-75, 2006.
- Kappes, U. P. et Runger, T. M. "No major role for 7,8-dihydro-8-oxoguanine in ultraviolet light-induced mutagenesis." *Radiat Res*, Vol: 164(4 Pt 1), P: 440-5, 2005.

- Kawanishi, S., Hiraku, Y., Pinlaor, S. et Ma, N. "Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis." *Biol Chem*, Vol: 387(4), P: 365-72, 2006.
- Kegel, A., Sjostrand, J. O. et Astrom, S. U. "Nej1p, a cell type-specific regulator of nonhomologous end joining in yeast." *Curr Biol*, Vol: 11(20), P: 1611-7, 2001.
- Keleher, C. A., Passmore, S. et Johnson, A. D. "Yeast repressor alpha 2 binds to its operator cooperatively with yeast protein Mcm1." *Mol Cell Biol*, Vol: 9(11), P: 5228-30, 1989.
- Khanna, K. K. et Jackson, S. P. "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." *Nat Genet*, Vol: 27(3), P: 247-54, 2001.
- Kim, J. K. et Choi, B. S. "The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'-->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement." *Eur J Biochem*, Vol: 228(3), P: 849-54, 1995.
- Kim, J. K., Patel, D. et Choi, B. S. "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*, Vol: 62(1), P: 44-50, 1995.
- Kosmoski, J. V., Ackerman, E. J. et Smerdon, M. J. "DNA repair of a single UV photoproduct in a designed nucleosome." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 98(18), P: 10113-8, 2001.
- Krogh, B. O. et Symington, L. S. "Recombination proteins in yeast." *Annu Rev Genet*, Vol: 38, P: 233-71, 2004.

- Kunkel, T. A. et Erie, D. A. "DNA mismatch repair." *Annu Rev Biochem*, Vol: 74, P: 681-710, 2005.
- Kunz, B. A. et Haynes, R. H. "Phenomenology and genetic control of mitotic recombination in yeast." *Annu Rev Genet*, Vol: 15, P: 57-89, 1981.
- Kurbanyan, K., Nguyen, K. L., To, P., Rivas, E. V., Lueras, A. M., Kosinski, C., Steryo, M., Gonzalez, A., Mah, D. A. et Stemp, E. D. "DNA-protein cross-linking via guanine oxidation: dependence upon protein and photosensitizer." *Biochemistry*, Vol: 42(34), P: 10269-81, 2003.
- Kuzminov, A. "Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda." *Microbiol Mol Biol Rev*, Vol: 63(4), P: 751-813, table of contents, 1999.
- Kyrion, G., Boakye, K. A. et Lustig, A. J. "C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol*, Vol: 12(11), P: 5159-73, 1992.
- Kyrion, G., Liu, K., Liu, C. et Lustig, A. J. "RAP1 and telomere structure regulate telomere position effects in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev*, Vol: 7(7A), P: 1146-59, 1993.
- LeBel, C., Larrivee, M., Bah, A., Laterreur, N., Lvesque, N. et Wellinger, R. J. "Assessing telomeric phenotypes." *Methods Mol Biol*, Vol: 313, P: 265-316, 2006.
- Lee, S. E., Paques, F., Sylvan, J. et Haber, J. E. "Role of yeast SIR genes and mating type in directing DNA double-strand breaks to homologous and non-homologous repair paths." *Curr Biol*, Vol: 9(14), P: 767-70, 1999.

- Lemontt, J. F. "Genetic and physiological factors affecting repair and mutagenesis in yeast." *Basic Life Sci*, Vol: 15, P: 85-120, 1980.
- Lettier, G., Feng, Q., de Mayolo, A. A., Erdeniz, N., Reid, R. J., Lisby, M., Mortensen, U. H. et Rothstein, R. "The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in *S. cerevisiae*." *PLoS Genet*, Vol: 2(11), P: e194, 2006.
- Li, T., Stark, M. R., Johnson, A. D. et Wolberger, C. "Crystal structure of the MATa1/MAT alpha 2 homeodomain heterodimer bound to DNA." *Science*, Vol: 270(5234), P: 262-9, 1995.
- Lieber, M. R. "The mechanism of human nonhomologous DNA end joining." *J Biol Chem*, Vol: 283(1), P: 1-5, 2008.
- Liew, L. P. et Norbury, C. J. "Telomere maintenance: all's well that ends well." *Arch Toxicol*, Vol: 83(5), P: 407-16, 2009.
- Lindahl, T. "Instability and decay of the primary structure of DNA." *Nature*, Vol: 362(6422), P: 709-15, 1993.
- Linger, B. R. et Price, C. M. "Conservation of telomere protein complexes: shuffling through evolution." *Crit Rev Biochem Mol Biol*, Vol: 44(6), P: 434-46, 2009.
- Liu, X. et Smerdon, M. J. "Nucleotide excision repair of the 5 S ribosomal RNA gene assembled into a nucleosome." *J Biol Chem*, Vol: 275(31), P: 23729-35, 2000.
- Livi, G. P. et Mackay, V. L. "Mating-Type Regulation of Methyl Methanesulfonate Sensitivity in *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*." *Genetics*, Vol: 95(2), P: 259-271, 1980.

- Livingstone-Zatchej, M., Marcionelli, R., Moller, K., de Pril, R. et Thoma, F. "Repair of UV lesions in silenced chromatin provides in vivo evidence for a compact chromatin structure." *J Biol Chem*, Vol: 278(39), P: 37471-9, 2003.
- Louis, E. J. et Haber, J. E. "The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution." *Genetics*, Vol: 124(3), P: 533-45, 1990.
- Louis, E. J. et Haber, J. E. "The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics*, Vol: 131(3), P: 559-74, 1992.
- Louis, E. J., Naumova, E. S., Lee, A., Naumov, G. et Haber, J. E. "The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics." *Genetics*, Vol: 136(3), P: 789-802, 1994.
- Lue, N. F. "Plasticity of telomere maintenance mechanisms in yeast." *Trends Biochem Sci*, Vol: 35(1), P: 8-17,
- Luger, K., Rechsteiner, T. J., Flaus, A. J., Wayne, M. M. et Richmond, T. J. "Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria." *J Mol Biol*, Vol: 272(3), P: 301-11, 1997.
- Luke, B., Panza, A., Redon, S., Iglesias, N., Li, Z. et Lingner, J. "The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell*, Vol: 32(4), P: 465-77, 2008.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. et Helleday, T. "Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks." *Nucleic Acids Res*, Vol: 33(12), P: 3799-811, 2005.

- Luo, K., Vega-Palas, M. A. et Grunstein, M. "Rap1-Sir4 binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast." *Genes Dev*, Vol: 16(12), P: 1528-39, 2002.
- Lustig, A. J. "Mechanisms of silencing in *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Opin Genet Dev*, Vol: 8(2), P: 233-9, 1998.
- Lyamichev, V. I., Frank-Kamenetskii, M. D. et Soyfer, V. N. "Protection against UV-induced pyrimidine dimerization in DNA by triplex formation." *Nature*, Vol: 344(6266), P: 568-70, 1990.
- Marmorstein, R. "Structure and chemistry of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases." *Biochem Soc Trans*, Vol: 32(Pt 6), P: 904-9, 2004.
- Martin, S. G., Laroche, T., Suka, N., Grunstein, M. et Gasser, S. M. "Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast." *Cell*, Vol: 97(5), P: 621-33, 1999.
- Martino, F., Kueng, S., Robinson, P., Tsai-Pflugfelder, M., van Leeuwen, F., Ziegler, M., Cubizolles, F., Cockell, M. M., Rhodes, D. et Gasser, S. M. "Reconstitution of yeast silent chromatin: multiple contact sites and O-AADPR binding load SIR complexes onto nucleosomes in vitro." *Mol Cell*, Vol: 33(3), P: 323-34, 2009.
- Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A. P., Carell, T. et Essen, L. O. "Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair." *Science*, Vol: 306(5702), P: 1789-93, 2004.
- Meier, A., Livingstone-Zatchej, M. et Thoma, F. "Repair of active and silenced rDNA in yeast: the contributions of photolyase and transcription-coupled nucleotide excision repair." *J Biol Chem*, Vol: 277(14), P: 11845-52, 2002.

- Mello, J. A. et Almouzni, G. "The ins and outs of nucleosome assembly." *Curr Opin Genet Dev*, Vol: 11(2), P: 136-41, 2001.
- Mello, J. A., Sillje, H. H., Roche, D. M., Kirschner, D. B., Nigg, E. A. et Almouzni, G. "Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway." *EMBO Rep*, Vol: 3(4), P: 329-34, 2002.
- Mellon, I. "Transcription-coupled repair: a complex affair." *Mutat Res*, Vol: 577(1-2), P: 155-61, 2005.
- Millar, C. B. et Grunstein, M. "Genome-wide patterns of histone modifications in yeast." *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol: 7(9), P: 657-66, 2006.
- Mills, K. D., Sinclair, D. A. et Guarente, L. "MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks." *Cell*, Vol: 97(5), P: 609-20, 1999.
- Mitchell, D. L., Nguyen, T. D. et Cleaver, J. E. "Nonrandom induction of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts in ultraviolet-irradiated human chromatin." *J Biol Chem*, Vol: 265(10), P: 5353-6, 1990.
- Moazed, D., Rudner, A. D., Huang, J., Hoppe, G. J. et Tanny, J. C. "A model for step-wise assembly of heterochromatin in yeast." *Novartis Found Symp.*, Vol: 259, P: 48-59, 2004.
- Moggs, J. G., Grandi, P., Quivy, J. P., Jonsson, Z. O., Hubscher, U., Becker, P. B. et Almouzni, G. "A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage." *Mol Cell Biol*, Vol: 20(4), P: 1206-18, 2000.

- Monson, E. K., de Bruin, D. et Zakian, V. A. "The yeast Cdc13 protein is required for the stable inheritance of transcriptionally repressed chromatin at telomeres." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 94(24), P: 13081-6, 1997.
- Morimatsu, K. et Kowalczykowski, S. C. "RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair." *Mol Cell*, Vol: 11(5), P: 1337-47, 2003.
- Morrison, A. J. et Shen, X. "Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes." *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol: 10(6), P: 373-84, 2009.
- Mortimer, R. K. "Radiobiological and genetic studies on a polyploid series (haploid to hexaploid) of *Saccharomyces cerevisiae*." *Radiat Res*, Vol: 9(3), P: 312-26, 1958.
- Nag, R., Gong, F., Fahy, D. et Smerdon, M. J. "A single amino acid change in histone H4 enhances UV survival and DNA repair in yeast." *Nucleic Acids Res*, Vol: 36(11), P: 3857-66, 2008.
- Nakai, S. et Mortimer, R. K. "Studies on the genetic mechanism of radiation-induced mitotic segregation in yeast." *Mol Gen Genet*, Vol: 103(4), P: 329-38, 1969.
- Nakano, T., Morishita, S., Katafuchi, A., Matsubara, M., Horikawa, Y., Terato, H., Salem, A. M., Izumi, S., Pack, S. P., Makino, K. et Ide, H. "Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks." *Mol Cell*, Vol: 28(1), P: 147-58, 2007.
- Niggli, H. J. et Cerutti, P. A. "Nucleosomal distribution of thymine photodimers following far- and near-ultraviolet irradiation." *Biochem Biophys Res Commun*, Vol: 105(3), P: 1215-23, 1982.

- Noll, M. "Internal structure of the chromatin subunit." *Nucleic Acids Res*, Vol: 1(11), P: 1573-8, 1974.
- Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W. et Weinert, T. A. "Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints." *Annu Rev Genet*, Vol: 36, P: 617-56, 2002.
- Ottaviani, A., Gilson, E. et Magdinier, F. "Telomeric position effect: from the yeast paradigm to human pathologies?" *Biochimie*, Vol: 90(1), P: 93-107, 2008.
- Palm, W. et de Lange, T. "How shelterin protects mammalian telomeres." *Annu Rev Genet*, Vol: 42, P: 301-34, 2008.
- Patterton, H. G. et Simpson, R. T. "Nucleosomal location of the STE6 TATA box and Mat alpha 2p-mediated repression." *Mol Cell Biol*, Vol: 14(6), P: 4002-10, 1994.
- Pehrson, J. R. et Cohen, L. H. "Effects of DNA looping on pyrimidine dimer formation." *Nucleic Acids Res*, Vol: 20(6), P: 1321-4, 1992.
- Pfeifer, G. P., You, Y. H. et Besaratinia, A. "Mutations induced by ultraviolet light." *Mutat Res*, Vol: 571(1-2), P: 19-31, 2005.
- Pirrotta, V. et Gross, D. S. "Epigenetic silencing mechanisms in budding yeast and fruit fly: different paths, same destinations." *Mol Cell*, Vol: 18(4), P: 395-8, 2005.
- Poplawski, T. et Blasiak, J. "[Non-homologous DNA end joining]." *Postepy Biochem*, Vol: 51(3), P: 328-38, 2005.
- Povirk, L. F. "DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes." *Mutat Res*, Vol: 355(1-2), P: 71-89, 1996.

- Prakash, S. et Prakash, L. "Nucleotide excision repair in yeast." *Mutat Res*, Vol: 451(1-2), P: 13-24, 2000.
- Prakash, S., Prakash, L., Burke, W. et Montelone, B. A. "Effects of the RAD52 Gene on Recombination in *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*." *Genetics*, Vol: 94(1), P: 31-50, 1980.
- Pryde, F. E. et Louis, E. J. "Limitations of silencing at native yeast telomeres." *EMBO J*, Vol: 18(9), P: 2538-50, 1999.
- Qin, X., Zhang, S., Zarkovic, M., Nakatsuru, Y., Shimizu, S., Yamazaki, Y., Oda, H., Nikaido, O. et Ishikawa, T. "Detection of ultraviolet photoproducts in mouse skin exposed to natural sunlight." *Jpn J Cancer Res*, Vol: 87(7), P: 685-90, 1996.
- Ramanathan, B. et Smerdon, M. J. "Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes." *J Biol Chem*, Vol: 264(19), P: 11026-34, 1989.
- Ramotar, D. et Wang, H. "Protective mechanisms against the antitumor agent bleomycin: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Genet*, Vol: 43(4), P: 213-24, 2003.
- Ravanat, J. L., Douki, T. et Cadet, J. "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components." *J Photochem Photobiol B*, Vol: 63(1-3), P: 88-102, 2001.
- Reed, S. H. "Nucleotide excision repair in chromatin: the shape of things to come." *DNA Repair (Amst)*, Vol: 4(8), P: 909-18, 2005.
- Rine, J. et Herskowitz, I. "Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics*, Vol: 116(1), P: 9-22, 1987.
- Rivier, D. H., Ekena, J. L. et Rine, J. "HMR-I is an origin of replication and a silencer in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics*, Vol: 151(2), P: 521-9, 1999.

- Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T. et Leiros, I. "DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it." *Cell Mol Life Sci*, Vol: 66(6), P: 981-93, 2009.
- Rochette, P. J., Therrien, J. P., Drouin, R., Perdiz, D., Bastien, N., Drobetsky, E. A. et Sage, E. "UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells." *Nucleic Acids Res*, Vol: 31(11), P: 2786-94, 2003.
- Rudner, A. D., Hall, B. E., Ellenberger, T. et Moazed, D. "A nonhistone protein-protein interaction required for assembly of the SIR complex and silent chromatin." *Mol Cell Biol*, Vol: 25(11), P: 4514-28, 2005.
- Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L. et Rine, J. "Ordered nucleation and spreading of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell*, Vol: 13(7), P: 2207-22, 2002.
- Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L. et Rine, J. "The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*." *Annu Rev Biochem*, Vol: 72, P: 481-516, 2003.
- Sambrook, J. et Russell, D. W. (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Filippo, J., Sung, P. et Klein, H. "Mechanism of eukaryotic homologous recombination." *Annu Rev Biochem*, Vol: 77, P: 229-57, 2008.
- Sancar, A. "Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors." *Chem Rev*, Vol: 103(6), P: 2203-37, 2003.

- Sander, M., Cadet, J., Casciano, D. A., Galloway, S. M., Marnett, L. J., Novak, R. F., Pettit, S. D., Preston, R. J., Skare, J. A., Williams, G. M., Van Houten, B. et Gollapudi, B. B. "Proceedings of a workshop on DNA adducts: biological significance and applications to risk assessment Washington, DC, April 13-14, 2004." *Toxicol Appl Pharmacol*, Vol: 208(1), P: 1-20, 2005.
- Santa Maria, S. R., Gangavarapu, V., Johnson, R. E., Prakash, L. et Prakash, S. "Requirement of Nse1, a subunit of the Smc5-Smc6 complex, for Rad52-dependent postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol*, Vol: 27(23), P: 8409-18, 2007.
- Schiestl, R. H., Reynolds, P., Prakash, S. et Prakash, L. "Cloning and sequence analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD9 gene and further evidence that its product is required for cell cycle arrest induced by DNA damage." *Mol Cell Biol*, Vol: 9(5), P: 1882-96, 1989.
- Schoeftner, S. et Blasco, M. A. "Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II." *Nat Cell Biol*, Vol: 10(2), P: 228-36, 2008.
- Setlow, R. B. et Carrier, W. L. "The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: An Error-Correcting Mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 51, P: 226-31, 1964.
- Simon, J. R. et Moore, P. D. "Induction of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet*, Vol: 214(1), P: 37-41, 1988.
- Smerdon, M. J. et Conconi, A. "Modulation of DNA damage and DNA repair in chromatin." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, Vol: 62, P: 227-55, 1999.

- Smith, S. et Stillman, B. "Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro." *Cell*, Vol: 58(1), P: 15-25, 1989.
- Southern, E. "Southern blotting." *Nat Protoc*, Vol: 1(2), P: 518-25, 2006.
- Stavenhagen, J. B. et Zakian, V. A. "Internal tracts of telomeric DNA act as silencers in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev*, Vol: 8(12), P: 1411-22, 1994.
- Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K. et Grunstein, M. "SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast." *Genes Dev*, Vol: 11(1), P: 83-93, 1997.
- Strathern, J., Hicks, J. et Herskowitz, I. "Control of cell type in yeast by the mating type locus. The alpha 1-alpha 2 hypothesis." *J Mol Biol*, Vol: 147(3), P: 357-72, 1981.
- Strathern, J., Shafer, B., Hicks, J. et McGill, C. "a/Alpha-specific repression by MAT alpha 2." *Genetics*, Vol: 120(1), P: 75-81, 1988.
- Sugasawa, K., Masutani, C. et Hanaoka, F. "Cell-free repair of UV-damaged simian virus 40 chromosomes in human cell extracts. I. Development of a cell-free system detecting excision repair of UV-irradiated SV40 chromosomes." *J Biol Chem*, Vol: 268(12), P: 9098-104, 1993.
- Suquet, C., Mitchell, D. L. et Smerdon, M. J. "Repair of UV-induced (6-4) photoproducts in nucleosome core DNA." *J Biol Chem*, Vol: 270(28), P: 16507-9, 1995.
- Talbert, P. B. et Henikoff, S. "Spreading of silent chromatin: inaction at a distance." *Nat Rev Genet*, Vol: 7(10), P: 793-803, 2006.

- Tamburini, B. A. et Tyler, J. K. "Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair." *Mol Cell Biol*, Vol: 25(12), P: 4903-13, 2005.
- Tang, M. S., Htun, H., Cheng, Y. et Dahlberg, J. E. "Suppression of cyclobutane and mean value of 6-4 dipyrimidines formation in triple-stranded H-DNA." *Biochemistry*, Vol: 30(28), P: 7021-6, 1991.
- Tanny, J. C., Kirkpatrick, D. S., Gerber, S. A., Gygi, S. P. et Moazed, D. "Budding yeast silencing complexes and regulation of Sir2 activity by protein-protein interactions." *Mol Cell Biol*, Vol: 24(16), P: 6931-46, 2004.
- Tatchell, K., Nasmyth, K. A., Hall, B. D., Astell, C. et Smith, M. "In vitro mutation analysis of the mating-type locus in yeast." *Cell*, Vol: 27(1 Pt 2), P: 25-35, 1981.
- Taylor, J. S., Garrett, D. S. et Cohrs, M. P. "Solution-state structure of the Dewar pyrimidinone photoproduct of thymidyl-(3'---5')-thymidine." *Biochemistry*, Vol: 27(19), P: 7206-15, 1988.
- Taylor, J. S., Lu, H. F. et Kotyk, J. J. "Quantitative conversion of the (6-4) photoproduct of TpdC to its Dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight." *Photochem Photobiol*, Vol: 51(2), P: 161-7, 1990.
- Teng, Y., Yu, Y., Ferreiro, J. A. et Waters, R. "Histone acetylation, chromatin remodelling, transcription and nucleotide excision repair in *S. cerevisiae*: studies with two model genes." *DNA Repair (Amst)*, Vol: 4(8), P: 870-83, 2005.
- Teng, Y., Yu, Y. et Waters, R. "The *Saccharomyces cerevisiae* histone acetyltransferase Gcn5 has a role in the photoreactivation and nucleotide excision repair of UV-

induced cyclobutane pyrimidine dimers in the MFA2 gene." *J Mol Biol*, Vol: 316(3), P: 489-99, 2002.

Terleth, C., Schenk, P., Poot, R., Brouwer, J. et van de Putte, P. "Differential repair of UV damage in rad mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: a possible function of G2 arrest upon UV irradiation." *Mol Cell Biol*, Vol: 10(9), P: 4678-84, 1990.

Terleth, C., van Sluis, C. A. et van de Putte, P. "Differential repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res*, Vol: 17(12), P: 4433-9, 1989.

Theis, K., Skorvaga, M., Machius, M., Nakagawa, N., Van Houten, B. et Kisker, C. "The nucleotide excision repair protein UvrB, a helicase-like enzyme with a catch." *Mutat Res*, Vol: 460(3-4), P: 277-300, 2000.

Thoma, F. "Repair of UV lesions in nucleosomes--intrinsic properties and remodeling." *DNA Repair (Amst)*, Vol: 4(8), P: 855-69, 2005.

Thoma, F., Koller, T. et Klug, A. "Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin." *J Cell Biol*, Vol: 83(2 Pt 1), P: 403-27, 1979.

Tijsterman, M., de Pril, R., Tasseront-de Jong, J. G. et Brouwer, J. "RNA polymerase II transcription suppresses nucleosomal modulation of UV-induced (6-4) photoproduct and cyclobutane pyrimidine dimer repair in yeast." *Mol Cell Biol*, Vol: 19(1), P: 934-40, 1999.

Toussaint, M. et Conconi, A. "High-throughput and sensitive assay to measure yeast cell growth: a bench protocol for testing genotoxic agents." *Nat Protoc*, Vol: 1(4), P: 1922-8, 2006.

- Tremblay, M., Teng, Y., Paquette, M., Waters, R. et Conconi, A. "Complementary roles of yeast Rad4p and Rad34p in nucleotide excision repair of active and inactive rRNA gene chromatin." *Mol Cell Biol*, Vol: 28(24), P: 7504-13, 2008.
- Tremblay, M., Toussaint, M., D'Amours, A. et Conconi, A. "Nucleotide excision repair and photolyase repair of UV photoproducts in nucleosomes: assessing the existence of nucleosome and non-nucleosome rDNA chromatin in vivo." *Biochem Cell Biol*, Vol: 87(1), P: 337-46, 2009.
- Triolo, T. et Sternglanz, R. "Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing." *Nature*, Vol: 381(6579), P: 251-3, 1996.
- Tseng, Y. C., Hung, J. L. et Wang, T. C. "Involvement of RecF pathway recombination genes in postreplication repair in UV-irradiated *Escherichia coli* cells." *Mutat Res*, Vol: 315(1), P: 1-9, 1994.
- Ulaner, G. A. et Giudice, L. C. "Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation." *Mol Hum Reprod*, Vol: 3(9), P: 769-73, 1997.
- Ura, K., Araki, M., Saeki, H., Masutani, C., Ito, T., Iwai, S., Mizukoshi, T., Kaneda, Y. et Hanaoka, F. "ATP-dependent chromatin remodeling facilitates nucleotide excision repair of UV-induced DNA lesions in synthetic dinucleosomes." *EMBO J*, Vol: 20(8), P: 2004-14, 2001.
- Ura, K. et Hayes, J. J. "Nucleotide excision repair and chromatin remodeling." *Eur J Biochem*, Vol: 269(9), P: 2288-93, 2002.
- van Attikum, H. et Gasser, S. M. "Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response." *Trends Cell Biol*, Vol: 19(5), P: 207-17, 2009.

- van de Putte, P., van Sluis, C. A., van Dillewijn, J. et Rorsch, A. "The location of genes controlling radiation sensitivity in *Escherichia coli*." *Mutat Res*, Vol: 2(2), P: 97-110, 1965.
- van Gool, A. J., Verhage, R., Swagemakers, S. M., van de Putte, P., Brouwer, J., Troelstra, C., Bootsma, D. et Hoeijmakers, J. H. "RAD26, the functional *S. cerevisiae* homolog of the Cockayne syndrome B gene ERCC6." *EMBO J*, Vol: 13(22), P: 5361-9, 1994.
- Verhage, R. A., Van de Putte, P. et Brouwer, J. "Repair of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: RAD4-independent strand-specific nucleotide excision repair of RNA polymerase I transcribed genes." *Nucleic Acids Res*, Vol: 24(6), P: 1020-5, 1996.
- Verreault, A. "De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle." *Genes Dev*, Vol: 14(12), P: 1430-8, 2000.
- Wang, C. I. et Taylor, J. S. "Site-specific effect of thymine dimer formation on dAn.dTn tract bending and its biological implications." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 88(20), P: 9072-6, 1991.
- Wang, Z. G., Wu, X. H. et Friedberg, E. C. "Nucleotide excision repair of DNA by human cell extracts is suppressed in reconstituted nucleosomes." *J Biol Chem*, Vol: 266(33), P: 22472-8, 1991.
- Ward, J. F. "DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, Vol: 35, P: 95-125, 1988.

- Weber, S. "Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase." *Biochim Biophys Acta*, Vol: 1707(1), P: 1-23, 2005.
- Wellinger, R. E. et Thoma, F. "Nucleosome structure and positioning modulate nucleotide excision repair in the non-transcribed strand of an active gene." *EMBO J*, Vol: 16(16), P: 5046-56, 1997.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D. J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J. L., Riles, L., Roberts, C. J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T. R., Wysocki, R., Yen, G. S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M. et Davis, R. W. "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis." *Science*, Vol: 285(5429), P: 901-6, 1999.
- Yamada, M., Hayatsu, N., Matsuura, A. et Ishikawa, F. "Y'-Help1, a DNA helicase encoded by the yeast subtelomeric Y' element, is induced in survivors defective for telomerase." *J Biol Chem*, Vol: 273(50), P: 33360-6, 1998.
- Yu, S., Owen-Hughes, T., Friedberg, E. C., Waters, R. et Reed, S. H. "The yeast Rad7/Rad16/Abf1 complex generates superhelical torsion in DNA that is required for nucleotide excision repair." *DNA Repair (Amst)*, Vol: 3(3), P: 277-87, 2004.

- Yu, Y., Teng, Y., Liu, H., Reed, S. H. et Waters, R. "UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol: 102(24), P: 8650-5, 2005.
- Zhang, Y., Rohde, L. H. et Wu, H. "Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair." *Curr Genomics*, Vol: 10(4), P: 250-8, 2009.
- Zhao, C., Georgellis, A., Flato, S., Palmberg, L., Thunberg, E. et Hemminki, K. "DNA adducts in human nasal mucosa and white blood cells from smokers and non-smokers." *Carcinogenesis*, Vol: 18(11), P: 2205-8, 1997.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. et van 't Riet, K. "Modeling of the Bacterial Growth Curve." *Appl Environ Microbiol*, Vol: 56(6), P: 1875-1881, 1990.