

THESE

présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Option : Biochimie

par

Pierre DAUBERSIES



MUTAGENESE INDUITE PAR LE 4NQO RÔLE MAJEUR DE L'ADDUIT EN N2 DE LA GUANINE

soutenue le 9 juin 1989, devant la commission d'examen



030 024079 5

Président : Professeur J. MONTREUIL

Rapporteurs : Professeur S. BALL
Docteur R. FUCHS

Examineurs : Docteur M.H. LOUCHEUX
Docteur B. BAILLEUL

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER,
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF,
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL,
PEREZ, ROIC, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI, Mes BEAUJEU, LELONG.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON, J. CORTOIS.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

M. A. DUBRULLE.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du solide
M. CABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BKEZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GRANELLE Jean jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBAKD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEQUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Génie des procédés et réactions chimiques
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERTRAND Hugues	Sciences Economiques et Sociales
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIS Pierre	Mécanique
M. BOISSIER Daniel	Génie civil
M. BOIVIN Jean Claude	Spectrochimie
M. BOUQUELET Stéphane	Biologie appliquée aux enzymes
M. BOUQUIN Henri	Gestion
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CATTEAU Jean pierre	Chimie organique
M. CAYATTE Jean Louis	Sciences Economiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. CHARET Pierre	Biochimie structurale
M. CHIVE Maurice	Composants électroniques optiques
M. COMYN Gérard	Informatique théorique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
M. CORIAT Benjamin	Sciences Economiques et Sociales
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Tectonique Géodynamique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DEJAEGER Roger	Electrochimie et Cinétique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences Economiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DHAMELINCOURT Paul	Chimie physique
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides

M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.A.E.)
Mme EVRARD Micheline	Génie des procédés et réactions chimiques
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FAUQUEMBERGUE Renaud	Composants électroniques
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GOURIEROUX Christian	Probabilités et statistiques
M. GREGORY Pierre	I.A.E.
M. GRENY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrice	Sciences Economiques
M. GRIMBLOT Jean	Chimie organique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.A.E.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANCRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEBVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEGRAND Pierre	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.A.E.)
M. LEROY Yves	Composants électroniques
M. LESENNE Jacques	Systèmes électroniques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean Marie	Optique - Physique atomique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MAURISSON Patrick	Sciences Economiques et Sociales
M. NESMACQUE Gérard	Génie Mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MORCELLET Michel	Chimie organique
M. MORTREUX André	Chimie organique
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
M. NICOLE Jacques	Spectrochimie
M. NOTELET Francis	Systèmes électroniques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée

M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POSTAIRE Jack	Informatique industrielle
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. KOBINET Jean Claude	EUDIL
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SONME Jean	Géographie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Systèmes électroniques
M. THIEBAULT François	Sciences de la terre
M. THUMERELLE Pierre	Démographie - Géographie Humaine
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOURSEL Bernard	Informatique
M. TREANTON Jean René	Sociologie du Travail
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VASSEUR Christian	Automatique
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WACRENIER Jean Marie	Electronique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
M. WEINSTEIN Olivier	Analyse économique de la recherche et développement
M. WERNER Georges	Informatique théorique
M. WOZNIAK Michel	Spectrochimie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Algèbre

A ma Fille, **ALICE**

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé à l'Institut de Recherches sur le Cancer de LILLE au sein de l'Unité 124 INSERM où Madame **M.H. LOUCHEUX**, Directrice de Recherche au CNRS, a bien voulu m'accueillir. Je tiens à la remercier pour la confiance qu'elle m'a accordée et l'intérêt constant qu'elle a témoigné envers mon travail.

Je tiens à honorer la mémoire de Monsieur **G. BISERTE**, Professeur de la Faculté de Médecine de Lille et Directeur de l'IRCL, et à le remercier pour la bienveillance dont il me fit toujours preuve.

Je tiens particulièrement à remercier Madame **S. ZOUTINA** et Monsieur **B. BAILLEUL**, Chargés de Recherche à l'INSERM et qui, par leurs conseils et leur dynamisme ont permis l'aboutissement de ce travail.

Monsieur **J. MONTREUIL**, Professeur à l'Université de LILLE I, me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Qu'il en soit vivement remercié.

J'exprime ici toute ma reconnaissance à Monsieur **R. FUCHS**, Directeur de Recherche au CNRS, pour ses conseils pertinents et pour l'accueil qu'il m'a toujours réservé dans son laboratoire strasbourgeois. Je le remercie également, ainsi que Monsieur **S. BALL**, Professeur à l'Université de LILLE I, d'avoir accepté de juger ce travail.

Que Madame **M.T. PICQUE**, Assistante-Ingénieur au CNRS, trouve ici toute ma reconnaissance pour son aide et son optimisme de tous les instants. Je remercie également tous les membres de l'Unité 124 pour leur soutien et leur sympathie.

Je tiens également à remercier **mes parents**, sans qui cette passion qu'est pour moi la Biologie Moléculaire n'aurait jamais pu connaître un tel accomplissement.

Merci enfin, à **Catherine**, pour la patience et la compréhension dont elle a su faire preuve durant ces derniers mois particulièrement laborieux.

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	p.1
<u>PREMIERE PARTIE : GENERALITES</u>	p.3
I. RELATION CANCEROGENESE CHIMIQUE-MUTAGENESE	p.4
II. ORIGINE DE L'ALTERATION DU MESSAGE GENETIQUE	p.6
III. METABOLISATION DES PRECANCEROGENES	p.7
V. FORMATION ET STRUCTURE DES ADDUITS	p.9
V. CONSEQUENCES DE LA FORMATION DES LESIONS DE L'ADN	p.13
A. <u>Perturbations structurales de l'ADN</u>	p.13
B. <u>Conséquences biologiques</u>	p.14
1. <u>Réparation des lésion</u>	p.15
1.1. Réversion directe	p.15
1.2. La réponse adaptative	p.16
1.3. Réparation par excision-resynthèse	p.16
1.3.1. Excision de base: ADN glycosylases et AP endonucléases	
1.3.2. Excision de nucléotides: le système UvrABC	
2. <u>Devenir des lésions non réparées</u>	p.21
2.1. Lésions informatives : réplication non bloquée	p.21
2.2. Lésions non codantes : blocage de la réplication	p.21
2.2.1. Recombinaison post-réplivative	
2.2.2. Induction du système SOS : mutagénèse	
VI. PRESENTATION DU TRAVAIL	p.29
A. <u>Modèle utilisé</u>	p.30
1. <u>Description</u>	p.30
2. <u>Avantages</u>	p.32

B. <u>Méthodes utilisées</u>	p.32
1. <u>Modification du plasmide entier</u>	p.32
2. <u>Modification ciblée sur le fragment 6S</u>	p.33
C. <u>Objectifs</u>	p.33
<u>DEUXIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION</u>	p.35
I. MODIFICATION CHIMIQUE DE L'ADN EN N2 OU EN C8 DE LA GUANINE	p.36
II. TOXICITE ET REPARATION DES ADDUITS DU 4NQO	p.38
A. <u>Toxicité</u>	p.38
B. <u>Réparation</u>	p.41
III. MUTAGENESE INDUITE PAR LES ADDUITS DU 4NQO	p.43
A. <u>Mutagénèse et système SOS</u>	p.44
B. <u>Mutagénicité des lésions</u>	p.45
IV. NATURE DES MUTATIONS INDUITES	p.49
A. <u>Mutations induites par l'adduit N2-G</u>	p.50
B. <u>Mutations induites par l'adduit C8-G</u>	p.54
C. <u>Sites apuriniques et mutagénèse induite</u>	p.56
D. <u>Mutagénèse induite par le 4NQO</u>	p.58
V. INFLUENCE DE LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE SUR LA MUTAGENESE	p.61
A. <u>Spectre de mutagénèse des adduits du 4NQO</u>	p.61
B. <u>Influence de la séquence 5'Pu-G sur la mutagénèse</u>	p.63
<u>CONCLUSION</u>	p.71
<u>APPENDICE I : Matériel et Méthodes</u>	p.75
<u>APPENDICE II : Bibliographie</u>	p.91

ABREVIATIONS

Dérivés de la quinoléine

4NQO	4-nitroquinoléine 1-oxyde
4HAQO	4-hydroxyaminoquinoléine 1-oxyde
Ac-4HAQO	4-acétoxyaminoquinoléine 1-oxyde
DiAc-4HAQO	O,O'-diacétyl-4-hydroxyaminoquinoléine 1-oxyde
4AQO	4-aminoquinoléine 1-oxyde

Autres cancérogènes

N-AAF	N-acétylamino fluorène
N-Aco-AAF	N-acétoxy-N-2-acétylamino fluorène
N-OH-AF	N-hydroxy-amino fluorène
GluP3	3-amino-4,6-diméthyl dipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazole
MNNG	N-méthyl-N'-nitro-nitrosoguanidine

Adduits

C8-G, dGuo-C8-AQO	N-(désoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoléine 1-oxyde
N2-G, dGuo-N2-AQO	3-(désoxyguanosin-N ² -yl)-4-aminoquinoléine 1-oxyde
N6-A, dAdo-N6-AQO	3-(désoxyadénosin-N ⁶ -yl)-4-aminoquinoléine 1-oxyde
<i>r.o.</i> C8-G, <i>r.o.</i> dGuo-C8-AQO	1-(1'-désoxyriboside)-1-[6-(2,5-diamino-4-oxopyrimidinyl)]-3-(4-quinoléinyl 1-oxyde) urée
C8-AAF, dGuo-C8-AAF	N-(désoxyguanosin-8-yl)-2-acétylamino fluorène
C8-AF, dGuo-C8-AF	N-(désoxyguanosin-8-yl)-2-amino fluorène
N2-AAF, dGuo-N2-AAF	3-(désoxyguanosin-N ² -yl)-2-acétylamino fluorène

Acides nucléiques

ADN (sb)	acide désoxyribonucléique (simple brin)
ARN	acide ribonucléique
A, T, G, C	adénine, thymine, guanine, cytosine
Pu, Py	purine, pyrimidine
ATP	adénosine-triphosphate
AMP	adénosine-monophosphate
AP (site)	apurinique/apyrimidique (site)

Divers

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ap, Tc, Cm	ampicilline, tétracycline, chloramphénicol
ERT	efficacité relative de transformation
Fm	fréquence de mutation
MCS	<i>Mutation Cross-section</i>
UV	rayonnement ultra-violet
CLHP	chromatographie liquide à haute pression

PUBLICATIONS

DAUBERSIES, P., HEYSEN, A., GALIEGUE-ZOITINA, S., BAILLEUL, B., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. DNA-damage by the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide: structural identification and mutagenesis of the main adducts. *Br. J. Cancer*, (1986), 54, 368-369.

BAILLEUL, B., DAUBERSIES, P. GALIEGUE-ZOITINA, S. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis. *Jpn J. Cancer*, (sous presse).

GALIEGUE-ZOITINA, S., DAUBERSIES, P., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H & BAILLEUL, B. Mutagenicity SOS function dependent of N-2 guanyl adduct is reminiscent of the high mutagen properties of 4NQO. (soumis pour publication)

DAUBERSIES, P., GALIEGUE-ZOITINA, S., KOFFEL-SCHWARTZ, N., FUCHS, R.P.P., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H & BAILLEUL, B. Mutation spectrum of the main 4-nitroquinoline 1-oxide adduct in *Escherichia coli*, (en préparation)

POSTERS

DAUBERSIES, P., HEYSEN, A., GALIEGUE-ZOITINA, S., BAILLEUL, B., & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. DNA-damage by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. Molecular biology of DNA repair. British photobiology Society and DNA repair network, Manchester, 16-18 Avril 1986.

HEYSEN, A., DAUBERSIES, P., GALIEGUE-ZOITINA, S., BAILLEUL, B. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. Toxicité et mutagénicité chez *E.coli* des lésions induites sur le DNA de pBR322 par le cancérigène 4-nitroquinoléine-1-oxyde. Forum des Jeunes Chercheurs. Toulouse. Juillet 1986.

HEYSEN, A., DAUBERSIES, P., GALIEGUE-ZOITINA, S., BAILLEUL, B., & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. DNA-damage and mutagenicity of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. XIVth annual meeting of the European Environmental. Mutagen Society. Bruxelles 25-30 Août 1986.

DAUBERSIES, P., GALIEGUE-ZOITINA, S., BAILLEUL, B., HENRY, C. KOFFEL-SCHWARTZ, N., FUCHS, R.P.P. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. DNA mutation spectrum of the major adduct of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide XVIII Annual Meeting EEMS, Varma, 3-8 octobre 1988.

BAILLEUL, B., COLLYN d'HOOGHE, M., DAUBERSIES, P., PLUMB, M. & BALMAIN, A. Enhancer-type element in the intron 0 of the mouse *c-Ha-ras*. Oncogenes and Onco-suppressor genes. EACR-sponsored Spring Symposium. Athènes, 27 mars-1 avril 1989.

DAUBERSIES, P., GALIEGUE-ZOITINA, S., KOFFEL-SCHWARTZ, N., FUCHS, R.P.P., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. & BAILLEUL, B. L'adduit sur le N2 de la guanine est le principale responsable de la haute mutagénicité du 4-nitroquinoléine 1-oxyde. Vème Forum Annuel. Société Française de Toxicologie Génétique. Paris, 20 avril 1989.

COMMUNICATION ORALE

DAUBERSIES, P., GALIEGUE-ZOITINA, S., BAILLEUL, B., & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. Etude de la Mutagénèse induite chez *E.coli* par un cancérigène chimique: l'oxyde de nitro-4-quinoléine. XIVe Forum des Jeunes Chercheurs, Lyon, 1-4 Septembre 1987.

INTRODUCTION

Les cancérrogènes chimiques constituent un ensemble de substances très diverses dont la principale propriété est de former dans la cellule des lésions de l'acide désoxyribonucléique, lésions qui sont à l'origine de mutations de l'ADN. Ces dernières années, de nombreux faits expérimentaux sont venus démontrer l'implication directe des processus mutagènes dans le phénomène de cancérisation. Les mécanismes de mutagénèse et les différents facteurs pouvant y jouer un rôle sont encore mal connus actuellement et font l'objet de nombreuses recherches fondamentales de part le monde. Un des principaux obstacles rencontrés dans ce domaine réside dans la diversité des lésions que peut induire un même cancérrogène et dans la difficulté d'obtenir un seul type de lésion de l'ADN.

Le travail présenté dans ce mémoire consiste en l'étude de chacune des deux principales lésions induites par une amine aromatique cancérrogène et mutagène : l'oxyde de nitro-4-quinoléine. Ce composé, fréquemment utilisé en expérimentation, forme principalement des lésions sur l'azote 2 ou sur le carbone 8 de la guanine. Grâce à l'utilisation d'un modèle de cancérrogène ultime du 4NQO, il nous est maintenant possible d'obtenir *in vitro* des ADN portant principalement l'une ou l'autre de ces lésions. Nous sommes donc en mesure d'étudier chacune d'elles et nous nous attacherons principalement à déterminer leur toxicité, leur pouvoir mutagène et leur spécificité mutationnelle respectives.

Mais avant de décrire ce travail, il nous a semblé utile et intéressant de faire le point sur les connaissances actuelles en matière de cancérogénèse chimique et particulièrement sur les mécanismes de réparation et de mutagénèse, principales conséquences de la formation des lésions de l'ADN.

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

I. RELATION CANCEROGENESE CHIMIQUE - MUTAGENESE

A l'heure actuelle, il semble bien démontré qu'une large proportion des cancers humains soit d'origine chimique. En effet, certaines études épidémiologiques semblent démontrer que 80 à 90% des cancers chez l'Homme sont dûs à notre environnement, au sens large du terme, c'est à dire y compris les éléments de notre mode de vie, tels que certaines habitudes sociales et alimentaires (Miller J.A., 1970; Miller E.C., 1978).

Depuis l'observation par l'anglais Pott en 1775, de la fréquence anormalement élevée des tumeurs du scrotum chez les ramoneurs, la liste des substances cancérigènes chez l'Homme s'est considérablement allongée. Cette liste comprend des cancérogènes «naturels» tels que l'aflatoxine B1, synthétisée par un champignon (*Aspergillus flavus*) ainsi que de nombreux cancérogènes «de synthèse» tels que des colorants, pesticides, matières plastiques ou dérivés du pétrole. Parmi ces derniers, se trouve un composé particulièrement cancérigène qui sera l'objet de notre étude : l'oxyde de nitro-4-quinoléine ou 4NQO, de l'appellation anglaise 4-nitroquinoline 1-oxide. Sa biologie est maintenant parfaitement connue chez l'animal de laboratoire et son pouvoir cancérigène fut mis en évidence chez la Souris dès 1957 par Nakahara (Nakahara *et al.*, 1957; pour revues : Sugimura, 1981; Endo *et al.*, 1971). Les organes cibles sont principalement le poumon, le pancréas et l'estomac.

Le 4NQO est une amine aromatique appartenant à la famille des quinoléines qui sont présentes dans les charbons, pétroles et goudrons et sont utilisées actuellement comme intermédiaires de synthèse et comme solvants. Le 4NQO est un produit de synthèse et son utilisation est maintenant interdite.

En général, il est bien évidemment difficile, voire même impossible, d'apporter des preuves irréfutables de l'action cancérigène d'un composé chimique sur l'Homme et les expériences directes de détection des cancérogènes potentiels ne pouvaient être menées que sur les animaux. Mais la plupart des cancérogènes ont la propriété d'être mutagènes, c'est à dire de provoquer des mutations de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Le terme mutation est alors applicable à toute modification héréditaire de la séquence nucléotidique de l'ADN ou tout changement du contenu génétique de la cellule par perte, duplication, réarrangement de nucléotides, gènes ou chromosomes. Dans le cas du 4NQO, cette propriété fut mise en évidence par Okabayashi dès 1953, c'est-à-dire avant même que son pouvoir cancérigène ne soit démontré (Endo *et al.*, 1971).

Utilisant cette propriété et afin d'éviter les tests classiques de détection des cancérogènes sur les animaux de laboratoire, trop longs (quelques mois à quelques années) et trop onéreux, plusieurs tests à court terme furent mis au point dès le début des années

1970. Un des premiers et des plus connus reste le test d'Ames qui mesure le pouvoir mutagène du composé chez une bactérie, *Salmonella typhimurium* (Ames *et al.*, 1975). Les tests actuels effectués sur des cellules procaryotes et eucaryotes détectent également la mutagenèse induite ou l'apparition d'aberrations chromosomiques diverses (Tennant *et al.*, 1987; Schiestl, 1989).

De l'ensemble des résultats obtenus, il apparaît que la grande majorité des cancérigènes ont pour cible l'ADN, support de l'information génétique. Ceci vient étayer une des hypothèses sur l'origine du cancer, la théorie de la mutation somatique énoncée dès 1914 par Boveri et qui met en jeu une altération du matériel génétique par l'intermédiaire d'une mutation de l'ADN.

Après la découverte des «gènes du cancer» ou oncogènes (Stehelin *et al.*, 1976), une des premières preuves mettant en relation la mutagenèse et la cancérogenèse fut apportée par l'équipe de Barbacid. Elle démontra qu'une simple mutation ponctuelle (guanine en thymine) dans l'oncogène humain *c-Ha-ras*, modifiant ainsi de glyco-colle en valine le 12ème acide aminé de la protéine codée, était un événement important dans l'apparition des tumeurs de la vessie chez l'Homme (Reddy *et al.*, 1982). En 1987, grâce à l'utilisation de souris transgéniques, Andres démontra l'association entre l'apparition de tumeurs mammaires et l'expression de l'oncogène *c-Ha-ras* muté sous contrôle d'un promoteur dépendant de la prolactine (Andres *et al.*, 1987).

Enfin, plus récemment ont été découverts les anti-oncogènes, capables de contrôler la différenciation cellulaire par inhibition de la multiplication des cellules. Lorsqu'une cellule perd un de ces gènes inhibiteurs, par réarrangement chromosomique ou par délétion, elle risque de proliférer et de s'établir en lignée cancéreuse. C'est ce qui a été démontré pour le gène *Rb*, premier anti-oncogène identifié et dont l'altération est à l'origine du rétinoblastome héréditaire, de certains ostéosarcomes et des cancers canaux du sein (Horowitz *et al.*, 1989; pour revue : Weinberg, 1988).

La preuve directe de l'implication des propriétés mutagènes des cancérigènes chimiques dans l'apparition de tumeurs fut apportée dès 1984 par Marshall en utilisant le benzopyrène-diol-époxyde, une des substances mutagènes de la fumée de cigarette; en effet, il démontra que le proto-oncogène *c-Ha-ras* modifié *in vitro* par ce composé pouvait être muté *in vivo* et conduire à la transformation maligne de cellules fibroblastiques de souris (Marshall *et al.*, 1984). D'autres preuves furent apportées par la suite; on démontra notamment qu'il existait une corrélation entre le type de mutation responsable de l'activation de *c-Ha-ras* et la spécificité mutationnelle du cancérigène utilisé pour activer ce proto-oncogène (Zarbl *et al.*, 1985; Quintanilla *et al.*, 1986; Barbacid, 1987; Bailleul *et al.*, 1988).

L'ensemble de ces résultats vient renforcer la théorie uniciste sur l'origine du cancer qui reconnaît d'une part, l'intervention des rétrovirus oncogènes et d'autre part, la

modification de l'expression des oncogènes cellulaires, qu'elle soit qualitative par mutation ponctuelle d'une région précise du gène, ou quantitative par modification de la régulation de son expression (Cooper, 1982, Bishop, 1983). La cancérogénèse chimique peut donc expliquer l'induction de certains cancers par l'apparition d'une simple mutation sur un gène particulier, cette mutagénèse étant alors l'événement initial de la transformation cellulaire.

II . ORIGINE DE L'ALTERATION DU MESSAGE GENETIQUE

L'instauration des mutations de l'ADN peut résulter de 2 types de mutagénèse :

- la mutagénèse spontanée qui résulte d'erreurs d'incorporation de la machinerie répliquative. *In vitro*, l'ADN Polymérase III d'*Escherichia coli* (*E.coli*) incorpore 1 nucléotide erroné pour 10^5 nucléotides synthétisés, taux ramené à 10^{-6} - 10^{-7} par l'activité de correction des erreurs d'appariement (*proofreading*) de cette enzyme (Bourguignon-Van Houren *et al.*, 1982). *In vivo*, les mécanismes de correction post-répliquatifs permettent d'abaisser ce taux à 10^{-10} (Wagner *et al.*, 1984). Ce type de mutagénèse est donc rare et sa fréquence a été estimée à 10^{-9} - 10^{-12} erreur par paire de base et par génération, aussi bien chez la Bactérie que chez l'Eucaryote supérieur (pour revue : Kunkel & Bebenek, 1988).

- la mutagénèse induite par des lésions de l'ADN. Ces lésions peuvent être formées par deux types de cancérogènes : physiques ou chimiques.

Les cancérogènes physiques comprennent les radiations ionisantes telles que les rayons X ou γ qui provoquent des «cassures simples brins» de l'ADN. On y trouve également les rayons ultra-violet (UV) qui forment essentiellement des pontages entre bases pyrimidiques adjacentes; les deux principaux types de lésions induites sont les dimères de pyrimidines de type cyclobutane (avec T-T>C-T>C-C) et les lésions (6-4) dipyrimidines. Les UV peuvent également induire des lésions sur une seule base telles que les hydrates de pyrimidine et les thymines glycols (pour revue : Friedberg, 1985).

Les cancérogènes chimiques se classent essentiellement en deux grandes catégories : (1) les agents alkylants : dans le cas général, ils ne sont pas métabolisés par la cellule et peuvent avoir une action directe par fixation de groupements alkyles sur l'ADN; (2) les cancérogènes qui devront d'abord être métabolisés par certaines enzymes cellulaires pour se fixer de façon covalente sur l'ADN. Ces composés également appelés précancérogènes retiendront plus particulièrement notre attention puisque parmi eux se trouve le 4NQO.

On peut également noter qu'il existe un type particulier de mutagénèse, induite à faible fréquence et en l'absence de dommage «extérieur». Dans ce cas, la lésion originale

est dite cryptique et résulte notamment de la formation d'un site abasique par dépurination ou dépyrimidination du nucléotide, phénomène inhérent à la stabilité chimique de l'ADN.

III. METABOLISATION DES PRECANCEROGENES

La notion de métabolisation des précancérogènes fut énoncée en 1970 par le «concept des Miller» (Miller J.A., 1970) qui fait apparaître une voie de détoxification et une voie d'activation du précancérogène après son entrée dans la cellule.

- l'activation comporte généralement deux étapes enzymatiques qui transforment le précancérogène en cancérogène intermédiaire puis en cancérogène ultime, espèce électrophile très réactive capable d'interagir directement avec les sites nucléophiles de la cellule tels que ceux de l'ADN, de l'ARN et des protéines. La première étape de cette activation métabolique a généralement lieu dans le réticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire (Miller & Miller, 1979).

- la détoxification est également une réaction enzymatique et va transformer le précancérogène en composé inactif. Le phénomène d'activation métabolique serait d'ailleurs un détournement accidentel de la voie de détoxification (Miller J.A., 1970).

Chez l'Eucaryote supérieur, les systèmes enzymatiques effecteurs de ces réactions sont inégalement répartis dans les différents organes; on les retrouve principalement dans le foie mais aussi le rein, le poumon et le transit gastro-intestinal (Weisburger & Williams, 1975). Les enzymes impliquées sont en général des oxydases à cytochrome P450 ou des époxyde-hydases (Lotlikar & Hong, 1981). Actuellement, il est encore difficile d'associer la spécificité d'action d'un précancérogène uniquement à sa métabolisation dans un organe donné; il est cependant intéressant de noter qu'un animal ne possédant pas ces systèmes d'activation enzymatique, comme le cobaye notamment, est insensible à l'action des précancérogènes.

Le métabolisme du 4NQO est maintenant parfaitement connu. La détoxification transforme le 4NQO essentiellement en 4-aminoquinoléine 1-oxyde et en 4-aminoquinoléine. L'activation, qui nous intéresse plus particulièrement ici, est représentée sur la figure 1 (voie de droite). *In vivo*, le 4NQO est d'abord réduit en 4-hydroxyaminoquinoléine 1-oxyde (4HAQO), cancérogène intermédiaire ou précurseur. L'enzyme responsable de cette conversion est la DT Diaphorase, une NAD(P)H-quinoléine oxydoréductase retrouvée dans la fraction cytosolique de différents organes (Sugimura, 1981; De Flora *et al.*, 1988).

Le 4HAQO subit une activation enzymatique par une aminoacyl-tRNA synthétase pour former l'aminoacyl-4HAQO. L'acide aminé généralement impliqué étant la sérine, le

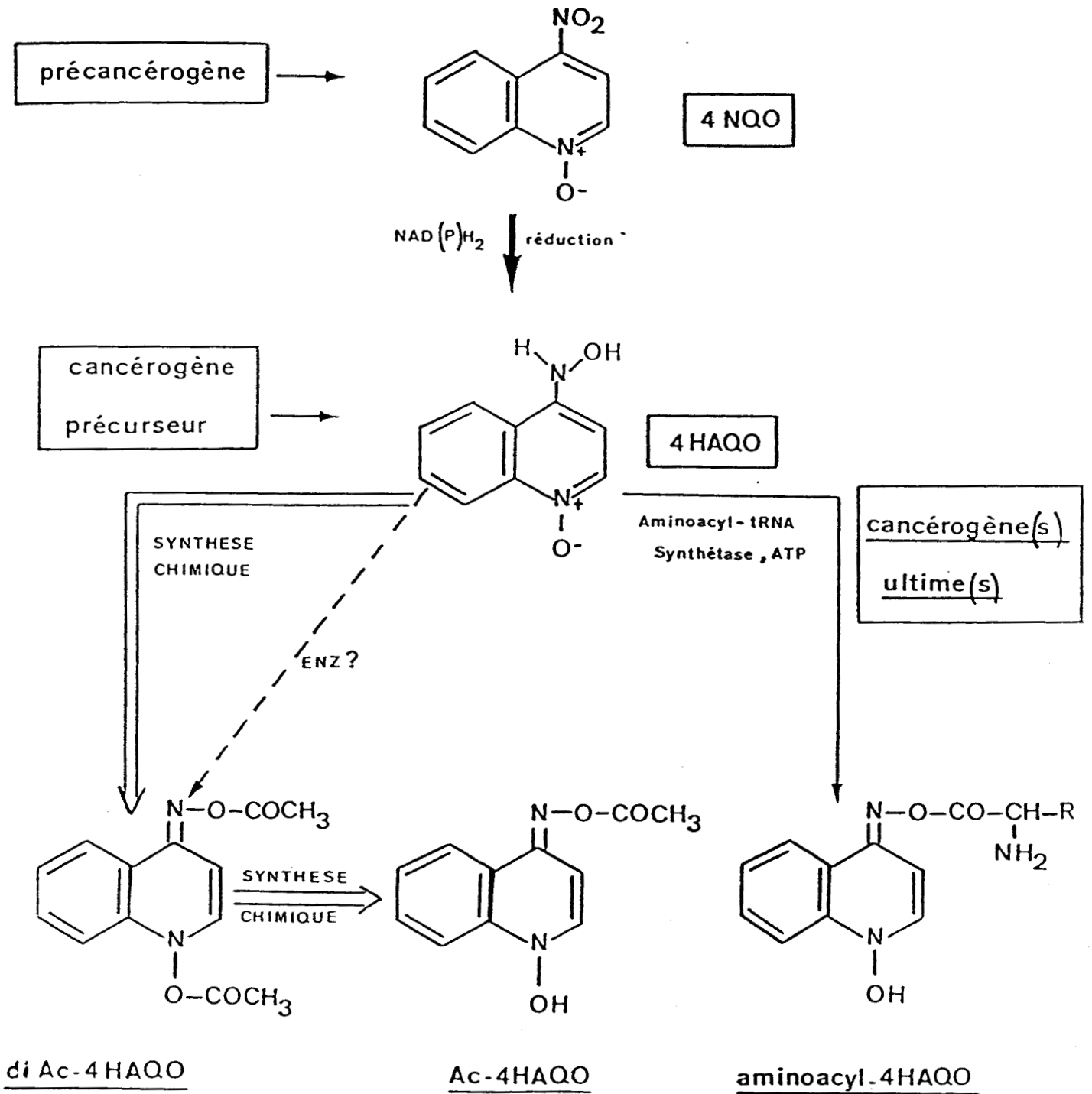


Figure 1 : Activation métabolique du 4NQO

cancérogène ultime du 4NQO est le séryl-4HAQO (Tada & Tada, 1975). Ce composé instable forme alors deux agents électrophiles puissants, un ion carbénium et un ion nitrénium (Bailleul *et al.*, 1981), capables d'intégrer directement, sans intervention d'enzyme, sur les sites nucléophiles cellulaires et en particulier sur les atomes riches en électrons de l'ADN (Bailleul *et al.*, 1981; Galiègue-Zouitina *et al.*, 1983).

Par liaison covalente sur un site donné, le cancérogène ultime forme alors un produit de substitution base-cancérogène également appelé adduit (de l'anglais *adduct*), principal responsable des conséquences biologiques des substances cancérogènes et notamment de la mutagenèse induite par ces composés.

Déterminer la nature et la structure des adduits formés par un cancérogène reste une étape difficile à mener *in vivo*. En effet, les voies enzymatiques empruntées au cours de l'activation métabolique sont généralement multiples et complexes; de plus, un même précancérogène peut conduire à la formation de plusieurs cancérogènes ultimes qui peuvent à leur tour se fixer sur différents sites nucléophiles de l'ADN pour former plusieurs types d'adduits.

Pour certains précancérogènes, ces difficultés ont pu être contournées grâce à la mise au point de modèles de cancérogènes ultimes capables de «mimer» *in vitro* ce qui se passe *in vivo*. Ces composés peuvent se fixer directement sur l'ADN sans aucune activation métabolique; ils permettent d'obtenir *in vitro* des ADN portant un ou plusieurs types d'adduits ce qui facilite l'étude des différentes lésions induites par un précancérogène.

Pour le 4NQO, le modèle de cancérogène ultime a été mis au point par le groupe au sein duquel notre travail a été réalisé. Ce composé est le mono-acétyl-4HAQO (Ac-4HAQO) obtenu à partir du DiAc-4HAQO en présence de dithiothréitol (Fig.1, voie de gauche et Fig.2). Ce modèle a été retenu pour son analogie structurale avec le séryl-4HAQO et son aptitude à donner *in vitro* une modification de l'ADN comparable à celle observée *in vivo* (Bailleul *et al.*, 1981; Galiègue-Zouitina *et al.*, 1985). C'est en utilisant ce modèle qu'il a été possible de déterminer la nature et la structure des différents adduits du 4NQO.

IV. FORMATION ET STRUCTURE DES ADDUITS

Les sites d'attaque des cancérogènes ultimes sur l'ADN sont nombreux et varient d'un cancérogène à l'autre (Irving, 1973; Sarma *et al.*, 1975) :

- pour les agents alkylants, il s'agit essentiellement des azotes 3 et 7 des bases puriques, de l'oxygène 6 de la guanine et des liaisons phosphotriesters.
- pour les précancérogènes, ces sites d'attaque sont très nombreux; nous ne citerons

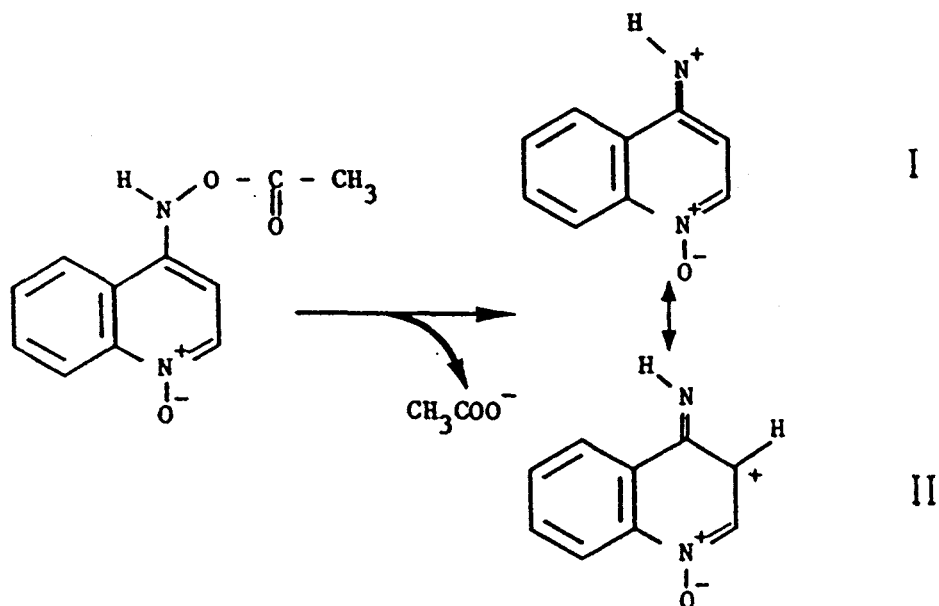


Figure 2 : Formation des ions nitrenium (I) et carbénium (II) à partir de l'Ac-4HAQO (d'après Bailleul *et al.*, 1981).

que les atomes N7, N3, C8 et N2 de la guanine, N1, N3, N7, et N6 de l'adénine, N3 de la cytosine, O4 et N3 de la thymine.

La nature et la structure des adduits formés va dépendre du ou des sites d'attaque préférentiels du cancérogène ultime sur l'ADN.

Une des premières études de la structure des lésions induites par une amine aromatique est celle effectuée sur les adduits du N-acétylamino-fluorène (N-AAF) dont nous reparlerons fréquemment ici. Le métabolisme de ce composé est particulièrement complexe et fait intervenir, entre autres, des sulfonations, estérifications, transacétylations ou déacétylations (Miller J.A., 1970; Singer & Grunberger, 1983). L'utilisation de deux modèles de cancérogènes ultimes a permis de déterminer la nature et la structure des principaux adduits (Kriek, 1972; Westra *et al.*, 1976): le N-acétoxy-N-2-acétylamino-fluorène (N-Aco-AAF) conduit principalement à la formation du dGuo-C8-AAF (adduit C8-AAF) alors que le N-hydroxy-aminofluorène (N-OH-AF) donne l'adduit désacétylé équivalent, le dGuo-C8-AF (adduit C8-AF). La modification *in vivo* conduit à la formation de 70% d'adduits C8-AF et 23% de C8-AAF. Un second adduit acétylé, formé en N2 de la guanine (adduit N2-AAF), est également formé mais ne représente que 3% de la modification totale *in vivo* (Miller J.A., 1970).

Dans le cas du N-AAF, il semble donc possible d'attribuer un type d'adduit à un cancérogène ultime particulier ce qui, nous allons le voir, n'est pas le cas du 4NQO pour lequel un seul cancérogène ultime a été identifié.

La première étude des adduits formés *in vivo* par le 4NQO a été réalisée par Tada et Tada. Par chromatographie d'hydrolysats d'ADN modifiés *in vitro* par le 4HAQO en présence de Séryl-tRNA Synthétase, ils identifièrent 3 adduits stables : 2 sur la guanine (QGI et QGII) et un sur l'adénine (QAII). Le 4AQO (4-aminoquinoléine 1-oxyde) est également obtenu au cours de l'hydrolyse acide; il a été proposé comme traduisant l'existence d'un adduit instable en milieu acide (Tada & Tada, 1976). Plus récemment, l'utilisation du modèle de cancérigène ultime a permis de modifier *in vitro* des quantités importantes d'ADN, de les hydrolyser et de séparer les différents adduits par chromatographie liquide haute pression (CLHP). Le profil d'éluion observé est alors comparable à celui que l'on obtient par CLHP d'ADN modifiés *in vivo* par le 4NQO; la structure de chacun des adduits a donc été déterminée (Fig.3) et attribuée aux différents adduits formés *in vivo* par le 4NQO (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1985). Il apparaît que l'adduit majoritaire *in vivo* est le 3-(désoxyguanosin-N²-yl)-4-aminoquinoléine 1-oxyde ou dGuo-N2-AQO que par commodité nous appellerons adduit N2-G; sa formation résulte de l'attaque de l'ion carbénium formé par le cancérigène ultime sur l'azote 2 de la guanine (Fig.2) (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1986); l'adduit N2-G représente 50% des lésions formées *in vivo* par le 4NQO. Le second adduit, le N-(désoxyguanosin-8-yl)-4AQO ou dGuo-C8-AQO (adduit C8-G) est représenté à 30% *in vivo*; sa formation résulte de l'attaque de l'ion nitrénium formé à partir de l'Ac-4HAQO sur le carbone 8 de la guanine (Fig.2) (Bailleul *et al.*, 1981; Demeunynck *et al.*, 1986). Un adduit mineur est formé sur l'azote 6 de l'adénine : le dAdo-N6-AQO ou adduit N6-A (15% de la modification *in vivo*) (Galiègue *et al.*, 1986). On observe également la formation de *ring-opened* dGuo-C8-AQO, adduit mineur obtenu *in vitro* par ouverture du cycle imidazole de l'adduit C8-G; il n'a pas été possible de déterminer si cet adduit est effectivement formé *in vivo* (Bailleul *et al.*, 1985).

La modification de l'ADN par le 4NQO peut également conduire à la formation de sites apuriques (sites AP). C'est ce qui ressort des travaux de l'équipe d'Abbondandolo qui utilise également l'Ac-4HAQO comme modèle de cancérigène ultime pour modifier l'ADN *in vitro* (Menichini *et al.*, 1989). Ces sites AP, fragiles en milieu basique, sont à l'origine des cassures simples brins observées par l'équipe de Waters au cours des gradients alcalins de sucrose effectués sur de l'ADN modifié *in vivo* par le 4NQO (Mirzayans *et al.*, 1981, 1985, 1988). L'origine des sites AP n'est pas connue mais l'adduit C8-G, instable en milieu faiblement basique, pourrait être le principal responsable de la formation de ces sites (Edwards *et al.*, 1987; Bailleul *et al.*, 1989).

La modification d'ADN *in vitro* par le 4HAQO en présence de séryl-AMP ou *in vivo* par le 4NQO peut conduire à la formation de résidus 8-hydroxyguanine sur l'ADN (Kohda *et al.*, 1987). Afin d'expliquer cette observation, l'auteur postula l'existence d'un adduit instable en N7 de la guanine.

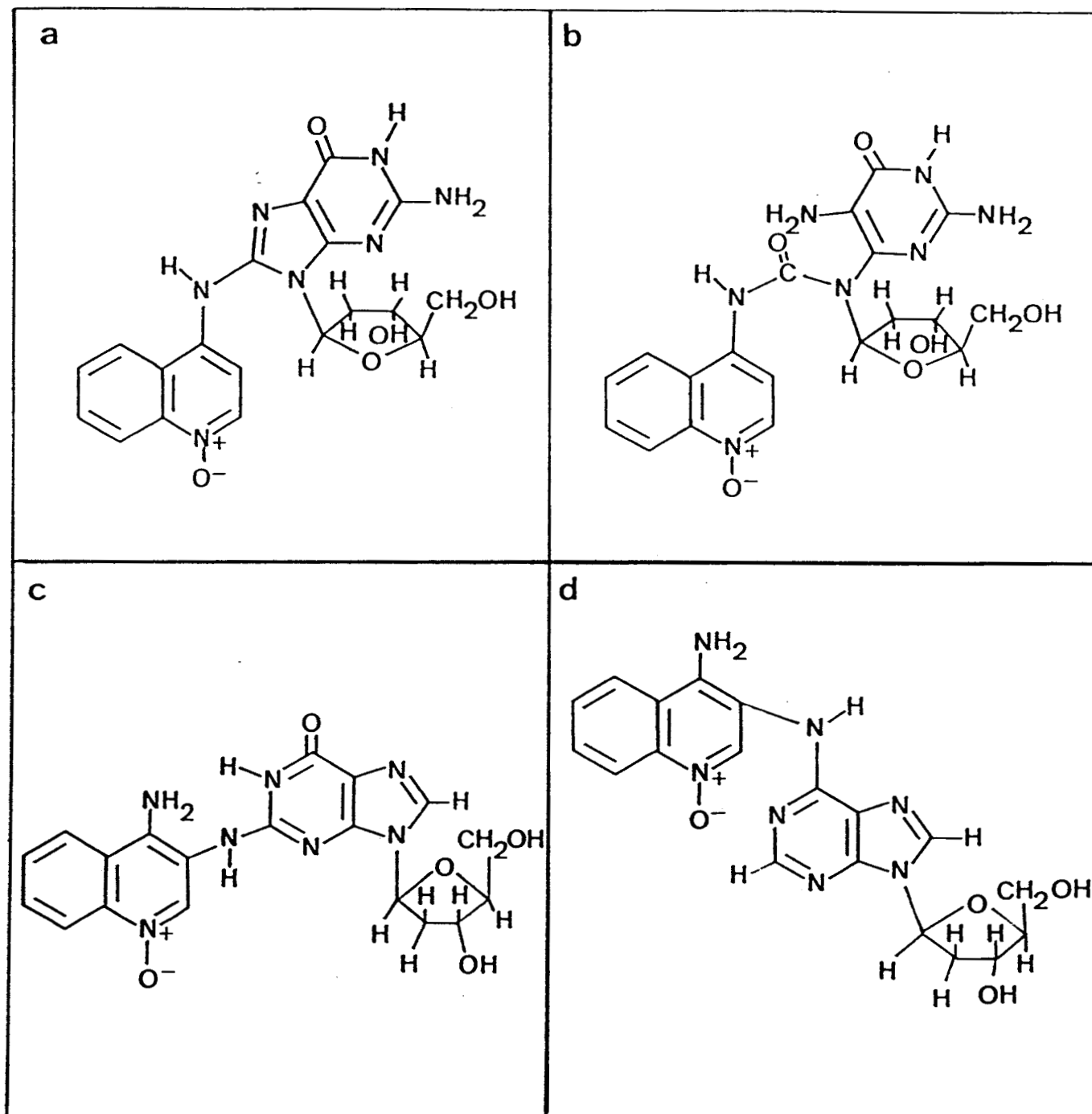


Figure 3 : Structure chimique des adduits connus du 4NQO. **a :** dGuo-C8-AQO; **b :** ring-opened dGuo-C8-AQO; **c :** dGuo-N2-AQO; **d :** dAdo-N6-AQO (d'après Galiègue-Zouitina *et al.*, 1985).

A partir d'un seul cancérigène ultime, le 4NQO est donc capable de former plusieurs types de lésions sur l'ADN, les plus représentées étant les trois adduits N2-G, C8-G et N6-A. Les effets biologiques du 4NQO ont été largement étudiés chez l'Animal mais il n'a jamais été possible de déterminer l'implication respective de chacun de ces adduits dans les propriétés *in vivo* du 4NQO. Ceci constitue d'ailleurs le principal objectif de notre étude.

V. CONSEQUENCES DE LA FORMATION DES LESIONS DE L'ADN

A. PERTURBATION STRUCTURALE DE L'ADN

La fixation covalente d'un cancérigène chimique sur l'ADN peut entraîner un changement conformationnel de la macromolécule. L'interaction du cancérigène avec la double hélice peut varier de manière importante selon la répartition électronique et l'encombrement stérique du composé.

Dans le cas des agents alkylants, la méthylation ou l'éthylation de l'ADN semble ne provoquer aucun changement conformationnel notable. Pour les adduits «volumineux» (de *bulky adduct*, par opposition aux lésions formées par les alkylants), la déformation induite sur l'ADN semble être spécifique de l'adduit formé et dépendre à la fois du site de fixation et de la nature de la molécule de précancérigène.

L'exemple des adduits du N-AAF permet d'illustrer parfaitement ce phénomène. L'adduit C8 acétylé (C8-AAF) provoque une distorsion importante de l'ADN traduite par le modèle d'«insertion-dénaturation» proposé par Fuchs (Fuchs *et al.*, 1976). Dans ce modèle, le noyau fluorène est inséré dans la double hélice, entre les paires de bases; la guanine substituée se trouve rejetée à l'extérieur, incapable de maintenir l'appariement avec la cytosine. Il en résulte une dénaturation locale importante de l'ADN pouvant impliquer de 5 à 50 paires de bases autour de la lésion. Au contraire, pour l'adduit C8-AF également porté en C8 de la guanine mais non acétylé, la déformation est beaucoup moins importante; le noyau fluorène se trouve à l'extérieur de l'hélice, l'appariement entre la guanine et la cytosine est maintenu : c'est le modèle «externe» (Evans, 1980; Leng, 1980). Pour l'adduit N2-AAF, de même nature que le C8-AAF mais présent en N2 de la guanine, la déformation conformationnelle induite semble également correspondre au modèle externe (Fuchs, 1975; Yamasaki *et al.*, 1977).

Dans le cas du 4NQO, différentes études physicochimiques et enzymatiques ont été réalisées par Galiègue-Zouitina et Bailleul mais le type de déformation induite n'a pas été déterminé. Pour l'adduit N2-G, probablement localisé dans le petit sillon et directement

impliqué dans l'appariement des paires de bases G:C, les auteurs ont émis l'hypothèse d'une distorsion importante de l'hélice avec insertion du noyau quinoléine entre les paires de bases. Au contraire, l'adduit C8-G localisé dans le grand sillon ne semble induire qu'une faible déformation de la double hélice, comparable au modèle externe. (Bailleul, 1984; Galiègue-Zouitina, 1984).

B. CONSEQUENCES BIOLOGIQUES

La fixation d'un cancérigène ultime sur l'ADN mais aussi sur l'ARN et les protéines doit avoir des conséquences graves et variées sur les nombreux processus vitaux de la cellule.

La principale conséquence biologique de la formation d'une lésion sur l'ADN est sa réparation par différents systèmes enzymatiques inductibles ou constitutifs de la cellule; on estime à 99% la proportion des lésions réparées par ces systèmes (Friedberg, 1985). La restauration du message génétique semble bien être une priorité pour la cellule et l'importance de ces mécanismes de réparation peut expliquer la gravité des maladies dites de la réparation de l'ADN telles que le *Xeroderma pigmentosum* (Cleaver, 1968; Hanawalt & Sarasin, 1986). En effet, les individus atteints par ce syndrome présentent une sensibilité anormale aux UV et un taux élevé d'épithéliomas cutanés; la démonstration de l'absence de réparation des lésions induites sur l'ADN de ces malades est un des exemples les plus probants chez l'Homme de l'initiation de certains cancers par les lésions non réparées de l'ADN (Sarasin *et al.*, 1988-a, 1988-b).

La conséquence directe des lésions non réparées de l'ADN (environ 1% dans la cellule normale) consiste en l'apparition de mutations généralement créées au niveau de la lésion prémutagène au cours de la réplication. Ce phénomène de mutagénèse induite est un des principaux sujets abordés au cours de notre étude des adduits 4NQO.

Ce chapitre ne se veut pas exhaustif et nous nous limiterons principalement aux connaissances acquises chez *E.coli*, bactérie dont les différents mécanismes de réplication, de réparation et de mutagénèse sont les mieux connus actuellement. De plus, cette étude étant consacrée aux mutagènes, nous ne traiterons pas la réparation des mauvais appariements de bases de type *dam-dependent* (pour revue : Friedberg, 1985) ou *very short patch repair* (Jones *et al.*, 1987) qui ne résultent pas de l'agression de la cellule par un agent extérieur.

1. Réparation des lésions

1.1. Réversion directe

Le moyen le plus simple qu'ait trouvé la cellule pour restaurer son matériel génétique est de réverter la lésion en une seule étape par action d'une seule enzyme. C'est le cas pour les dimères de pyrimidine qui, en présence de lumière visible, peuvent être supprimés de l'ADN par des enzymes de photoréactivation ou photolyases (Setlow, 1968). Les gènes codant pour ces enzymes chez *E.coli* ont été clonés et nommés *phrA* et *phrB* (Sutherland *et al.*, 1972; Young & Smith, 1978; Sancar & Ruppert, 1978); il apparaît que ces enzymes sont capables de monomériser les dimères pyrimidiques par conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique et cela grâce à des chromophores tels que le flavine-adénine-dinucléotide (Sancar & Sancar, 1984) ou la ptérine (Johnson *et al.*, 1988).

Les cassures simples brins produites par certains agents ionisants tels que les rayons X ou γ sont dues à la rupture de la liaison phosphodiester de l'ADN et peuvent être également réparées par réversion directe. Ce type de réparation se fait par simple «religation» des extrémités libres, catalysée par la Polynucléotide Ligase en présence d'adénosine-triphosphate (ATP) et de nicotinamide-adénine-dinucléotide; il faut noter que seules les cassures présentant deux extrémités 3''hydroxyle et 5''phosphate adjacentes sont sujettes à ce type de réversion (Jacobs *et al.*, 1972).

Certaines lésions induites par les agents alkylants peuvent également être réparées directement, par transfert du groupement alkyle sur une enzyme spécifique. C'est le cas de la O⁶-Méthyl-Guanine ADN Méthyl-Transférase ou protéine Ada (codée par le gène *ada*) capable de transférer le groupement méthyle de l'oxygène 6 de la guanine sur sa propre cystéine 321 ainsi que le méthyle des résidus méthylphosphotriesters sur sa cystéine 69. Cette enzyme est en fait une «enzyme suicide» puisque ce transfert est irréversible et inactive totalement la protéine (Téo *et al.*, 1986). Plus récemment, l'équipe de Margison caractérisa chez *E.coli* une enzyme apparentée à la protéine Ada : la O⁶-Alkyl-Guanine ADN Alkyl-Transférase ou Ogt, codée par le gène *ogt* et capable également de transférer les groupements O⁶-alkyles de la guanine sur une cystéine (Potter *et al.*, 1987). Alors que la protéine Ogt est constitutive, l'inactivation de l'enzyme Ada a pour conséquence l'induction d'un type de réparation spécifique des alkylants : la «réponse adaptative» que nous traiterons séparément puisqu'elle utilise à la fois la réversion directe et les mécanismes d'excision par certaines ADN glycosylases (voir 1.3.1).

1.2. La réponse adaptative

Lorsque *E.coli* est traité par de faibles doses d'agents alkylants tels que la N-méthyl-N'-nitro-nitrosoguanidine (MNNG) ou le N-méthyl-N-nitrosourée (MNU), un système enzymatique est induit et les cellules deviennent résistantes à l'effet léthal et mutagène d'une seconde exposition aux alkylants (Samson & Cairns, 1977; Sekiguchi & Nakabeppu, 1987; Volkert, 1988). Cette induction, connue sous le nom de réponse adaptative est principalement sous le contrôle de la O⁶-Méthyl-Guanine ADN Méthyl-Transférase codée par le gène *ada* et que nous appellerons protéine Ada (Fig.4). Par réversion des lésions formées, la protéine Ada devient méthylée et peut se fixer sur la région promotrice de son propre gène qui est alors surexprimé (Téo *et al.*, 1986). Les protéines Ada nouvellement synthétisées se fixent à leur tour sur les promoteurs d'une série de gènes qui sont alors déreprimés pour la transcription. Parmi ces gènes se trouve *alkA*, codant pour la 3-Méthyl-Adénine ADN Glycosylase II (protéine AlkA ou Tag II), spécifique des lésions 3- et 7-méthyl-guanine, O²-méthyl-thymine et -cytosine et 7-méthyl-adénine (Evenson & Seeburg, 1982; Karan *et al.*, 1982). Les produits des autres gènes impliqués, *aid B, C, I* et *alkB* (qui appartient à l'opéron *ada-alkB*) ont une fonction encore inconnue actuellement. Globalement, la réponse adaptative a donc pour principale conséquence l'induction de la protéine Tag II, de spécificité plus large que la protéine Ada limitée à la réversion des lésions de l'oxygène 6 de la guanine et des phosphotriesters.

Parallèlement, une grande partie des lésions 3-méthyl-adénine sont excisées par la protéine Tag I ou 3-Méthyl-Adénine ADN Glycosylase I codée par le gène *tag* qui lui n'appartient pas au système adaptatif (Karran *et al.*, 1982). Tag I et Tag II sont deux enzymes appartenant à la famille des ADN glycosylases dont le mode d'action est décrit dans le chapitre suivant.

1.3. Réparation par excision-resynthèse

Parallèlement à la réparation par réversion directe qui reste limitée à certains types de lésions, la cellule a développé différents systèmes de réparation capables d'exciser soit la base modifiée par le cancérigène, soit un fragment d'ADN portant la lésion.

1.3.1. Excision de base : ADN glycosylases et AP endonucléases

Dans ce cas, la base modifiée est excisée par une ADN glycosylase qui catalyse la

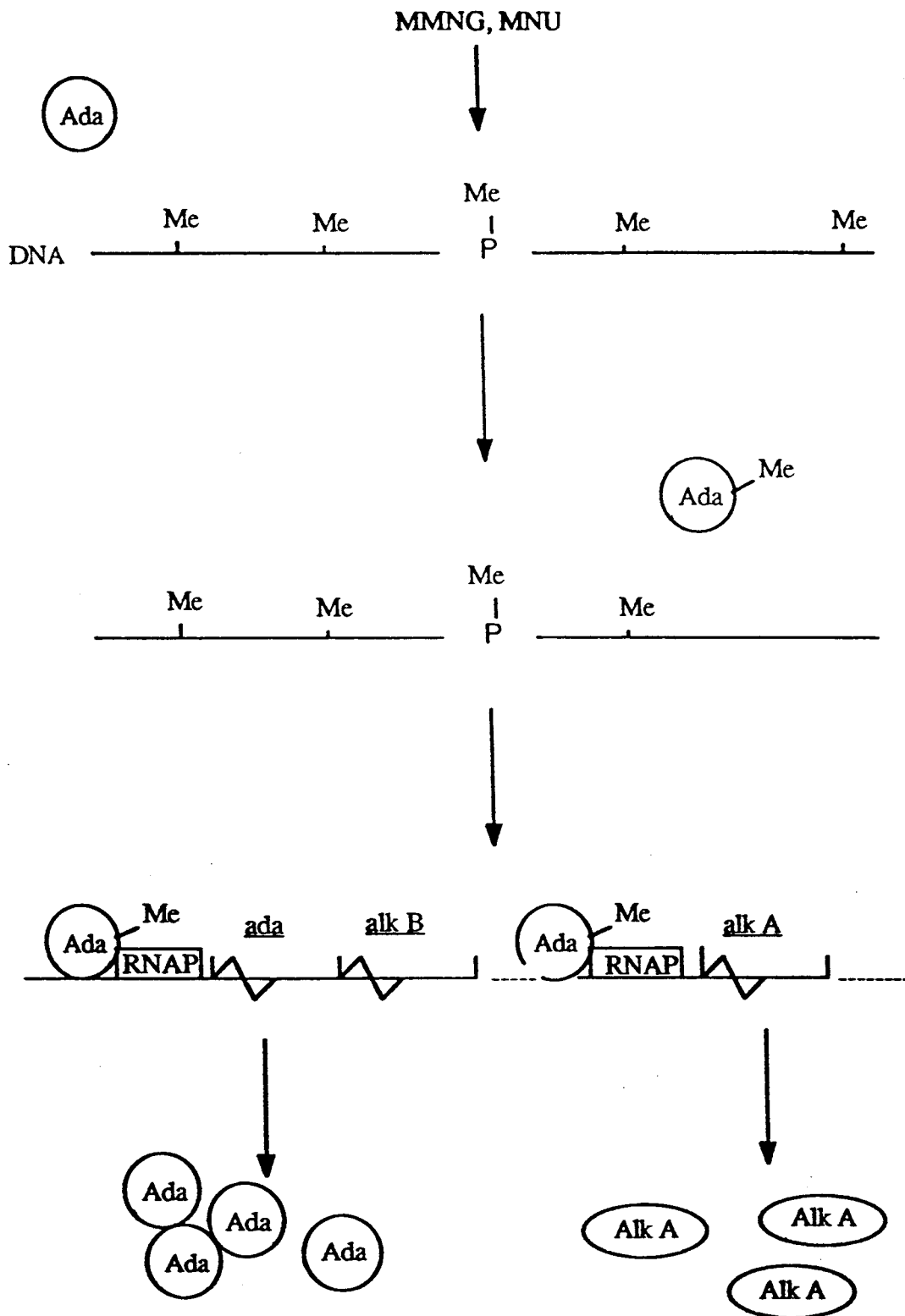


Figure 4 : Régulation de la réponse adaptative; Me: groupement méthyle, RNAP: ARN polymérase (d'après Teo *et al.*, 1986)

coupure de la liaison N-glycosidique et provoque l'apparition de sites apuriniques ou apyrimidiques (sites AP) (Hanawalt *et al.*, 1979). Ces enzymes sont spécifiques de la lésion qu'elles excisent; en voici quelques exemples chez *E.coli* (pour revues : Friedberg, 1985 et Wallace, 1988) :

- les 3-Méthyl-Adénine ADN Glycosylases I et II (Tag I et II) : la Tag II est de spécificité plus large que la Tag I et participe à la réponse adaptative (voir 1.2.).

- l'Uracile ADN Glycosylase (codée par le gène *ung*) et l'Hypoxanthine ADN Glycosylase, dont les substrats proviennent respectivement de la désamination spontanée de la cytosine et de l'adénine.

- les Formamidopyrimidine 5,6,Thymine Hydrate ADN Glycosylase et Urée ADN Glycosylase : elles sont spécifiques de certaines lésions induites par les radiations ionisantes.

- la Pyrimidine-Dimère ADN Glycosylase : on ne la retrouve que chez *E.coli* infecté par le phage T4 et chez *Micrococcus luteus*; je cite cette enzyme ici bien qu'elle excise au moins les deux bases portant le dimère.

Au niveau des sites AP créés, différentes enzymes peuvent intervenir et vont inciser la lésion phosphodiester soit en 3' (activité de classe I) soit en 5' (activité de classe II) du site AP, cette dernière activité étant la plus fréquemment observée. Ces enzymes se classent en 3 grandes catégories (pour revue : Wallace, 1988) :

- les AP endonucléases «simples», généralement de classe II, telles que l'Endonucléase IV codée par le gène *nfo*, l'Endonucléase V ou l'Endonucléase VII dont le substrat est de l'ADN simple brin.

- les AP endonucléases à activité ADN glycosylasique associée telles que l'Endonucléase III codée par le gène *nth*, ou les Endonucléases VIII et IX, toutes les trois étant de classe I; on retrouve également la Pyrimidine-Dimère ADN Glycosylase citée plus haut et présentant une activité de classe II similaire à celle de l'Endonucléase IV.

- les AP endonucléases telles que l'Exonucléase III, codée par le gène *xth* et qui, en plus de son activité de classe II, se comporte comme une 3'-5' exonucléase, une 3' phosphatase et une RNase H. Cette enzyme était précédemment baptisée Endonucléase III et Endonucléase VI.

L'Exonucléase III et l'Endonucléase IV représentent respectivement 80-90% et 8-10% des activités AP endonucléasiques observées *in vivo* chez *E.coli*.

Par le jeu de ces différentes enzymes, le brin en voie de réparation présente alors un 3' hydroxyle et un 5' phosphate libres, substrats compatibles à la resynthèse du ou des nucléotides manquants par l'ADN Polymérase I suivie de la ligation par l'ADN Ligase.

1.3.2. Excision de nucléotides : le système UvrABC

Les différents types de réparation décrits précédemment restent cependant limités puisque spécifiques de certaines lésions. Mais la cellule a su développer un système de réparation sans erreur et de spécificité beaucoup plus large : le système UvrABC. Ce système est capable d'exciser la majorité des lésions induites par les UV (Howard-Flanders *et al.*, 1965; Seeberg *et al.*, 1976; Franklin & Haseltine, 1984) mais aussi la plupart des adduits volumineux formés par les cancérigènes chimiques (Seeberg, 1981; Fuchs & Seeburg, 1984; Sancar *et al.*, 1985) dont le 4NQO (Kondo *et al.*, 1970; Ikenaga *et al.*, 1975). Récemment, Van Houten démontrait même que les lésions induites par le MNNG (qui est pourtant un agent alkylant) étaient réparées par ce système (Van Houten & Sancar, 1987).

Bien qu'étudié depuis 30 ans, le mécanisme chez *E.coli* ne commence à être compris que depuis quelques années, notamment grâce au clonage des différents gènes impliqués : *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* et *uvrD* (Sancar *et al.*, 1981-a et 1981-b; Yookum & Grossman, 1981; Oeda *et al.*, 1981). On peut distinguer deux grandes étapes (Sancar & Rupp, 1983) (Fig.5) :

- la reconnaissance de la lésion et l'incision du brin d'ADN de part et d'autre de la lésion
- le relargage du fragment créé et la resynthèse de l'ADN

La première étape fait intervenir, chronologiquement, le produit des gènes *uvrA*, *B* et *C* qui vont former l'exonucléase UvrABC. La protéine UvrA présente dans sa structure 2 formations en «doigt de zinc» (*Zinc-Finger*) dont l'une contient une activité ATPasique et l'autre présente une affinité pour l'ADN qui lui permet de se fixer en des sites non spécifiques de la double hélice (Berg, 1986). La protéine UvrB se fixe alors sur le complexe UvrA-ADN en augmentant l'affinité du complexe formé pour l'ADN et l'activité ATPasique d'UvrA (Kacinski & Rupp, 1983; Thomas *et al.*, 1985). Par hydrolyse d'ATP, ce complexe se déplace le long de l'ADN dans le sens 5'-3' en se comportant comme une hélicase, c'est à dire en déroulant une courte région d'ADN au niveau du complexe (Oh & Grossman, 1986 et 1987). Lorsqu'une lésion est rencontrée (un dimère de pyrimidine, par exemple), cette activité hélicase est inhibée et le complexe s'arrête pour former un complexe ternaire stable, opposé à la lésion, ce qui permet d'éviter le problème d'encombrement stérique dû aux adduits volumineux (Sancar & Rupp, 1983; Sancar & Sancar, 1988). En fait, le complexe UvrA-UvrB reconnaît plutôt la modification structurale de l'ADN provoquée par la lésion que la lésion elle-même; ceci permet d'expliquer la grande diversité de substrats du système UvrABC.

La protéine UvrC, nécessaire à l'incision, vient se fixer pour former un complexe ADN-UvrA-UvrB-UvrC qui se comporte comme une endonucléase (Yeung *et al.*, 1983). La protéine Uvr responsable de l'incision n'est pas connue actuellement mais récemment,

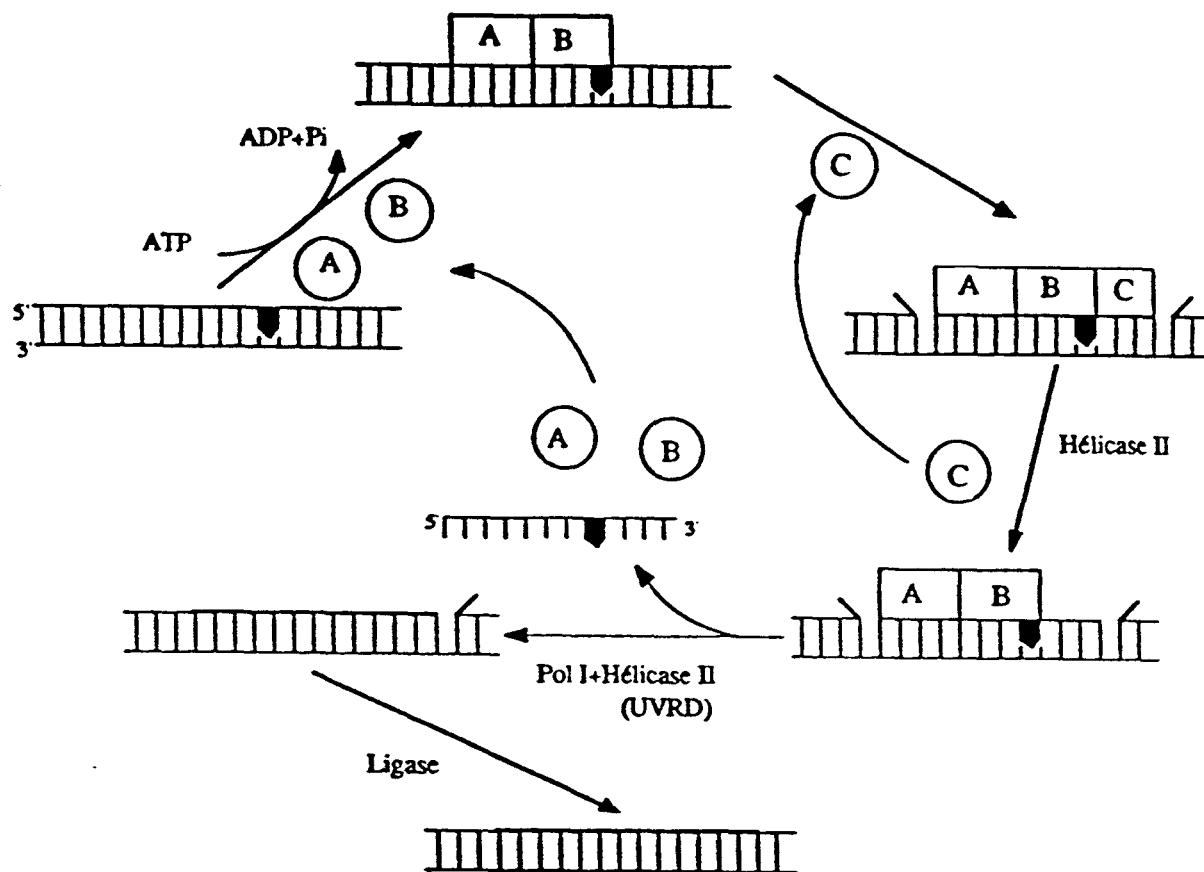


Figure 5 : Modèle de fonctionnement du système UvrABC

Sancar proposait un modèle selon lequel la fixation d'UvrC sur UvrB permettrait de «pousser» les 2 doigts de zinc d'UvrA dans le grand sillon, de part et d'autre de la lésion. Les sites nucléophiles de ces doigts seraient alors à proximité des liaisons phosphodiester qui vont être clivées par le complexe (Sancar & Sancar, 1988).

L'incision peut alors se faire; en 5', elle se situe au niveau de la 8ème liaison phosphodiester à partir de la lésion; en 3', elle se fait au niveau de la 5ème liaison phosphodiester pour les cancérigènes chimiques (psoralène, N-AAF, 4NQO) et au niveau de la 4ème ou de la 5ème liaison phosphodiester pour les dimères de pyrimidine (Sancar & Rupp, 1983; Yeung *et al.*, 1983).

Au cours de la seconde étape, le fragment de 12 ou 13 nucléotides créé ainsi que l'exonucléase UvrABC sont ôtés de la double hélice mais le mécanisme exact n'est pas connu. Il fait intervenir le produit des gènes *uvrD* et *polA* qui codent respectivement pour UvrD (ou Hélicase II) et l'ADN Polymérase I (Pol I) (Hussain *et al.*, 1985; Kumura *et al.*, 1985; Caron *et al.*, 1985). Selon certains auteurs, Pol I et UvrD se fixent au niveau de l'incision

en 5'; Pol I assure la resynthèse du brin endommagé tout en libérant l'oligomère alors que UvrD se déplace dans le même sens, sur le brin opposé et dissocie le complexe UvrABC resté attaché à cet oligomère (Matson, 1986; Sancar & Sancar, 1988; Van Houten *et al.*, 1988). Le duplex restauré est alors religué par l'ADN Ligase, la structure en double hélice est rétablie et les protéines Uvr peuvent assurer un nouveau cycle de réparation.

Les différentes protéines de ce système sont présentes de manière constitutive dans la cellule non agressée mais en faible quantité; cependant, les gènes *uvrA*, *B* et *D* appartiennent à un système inductible par certaines lésions de l'ADN: le système SOS, décrit plus loin; la régulation du gène *uvrC* n'est pas clairement établie (Ganessan & Hanawalt, 1985; Peterson & Mount, 1987; Backendorf *et al.*, 1983; Fogliano *et al.*, 1981).

2. Devenir des lésions non réparées

Bien que très efficaces, les différents systèmes de réparation fidèle de l'ADN ne peuvent éliminer la totalité des lésions induites par un cancérigène. Lorsqu'une lésion non réparée interagit avec la fourche répliquative, elle peut avoir les conséquences les plus graves pour la cellule avec blocage de la machinerie répliquative et/ou fixation d'une mutation du message génétique.

2.1. Lésions informatives : répliquative non bloquée

Il n'y a pas de blocage de la répliquative, l'ADN Polymérase incorpore une base erronée ou non face à la lésion : c'est le «mauvais codage direct» ou *direct-miscoding*, mécanisme caractéristique des agents alkylants. Face à une lésion O⁶-méthyl-guanine par exemple, l'ADN polymérase incorpore une cytosine dans 80% des cas et le message génétique est respecté. Au contraire, dans 20% des cas, l'enzyme incorpore une thymine face à la lésion; il en résulte une mutation par substitution d'une guanine par une adénine (Loechler *et al.*, 1984). Ce type de mutation (G en A) est d'ailleurs caractéristique des agents alkylants et représente environ 95% de la mutagénèse induite par ces agents (Abbott & Shaffhill, 1979; Burns *et al.*, 1986, 1987, 1988).

2.2. Lésions non codantes : blocage de la répliquative

Contrairement aux agents alkylants, de nombreux adduits volumineux mais aussi les sites abasiques et les dimères de pyrimidine sont dits non codants et peuvent bloquer

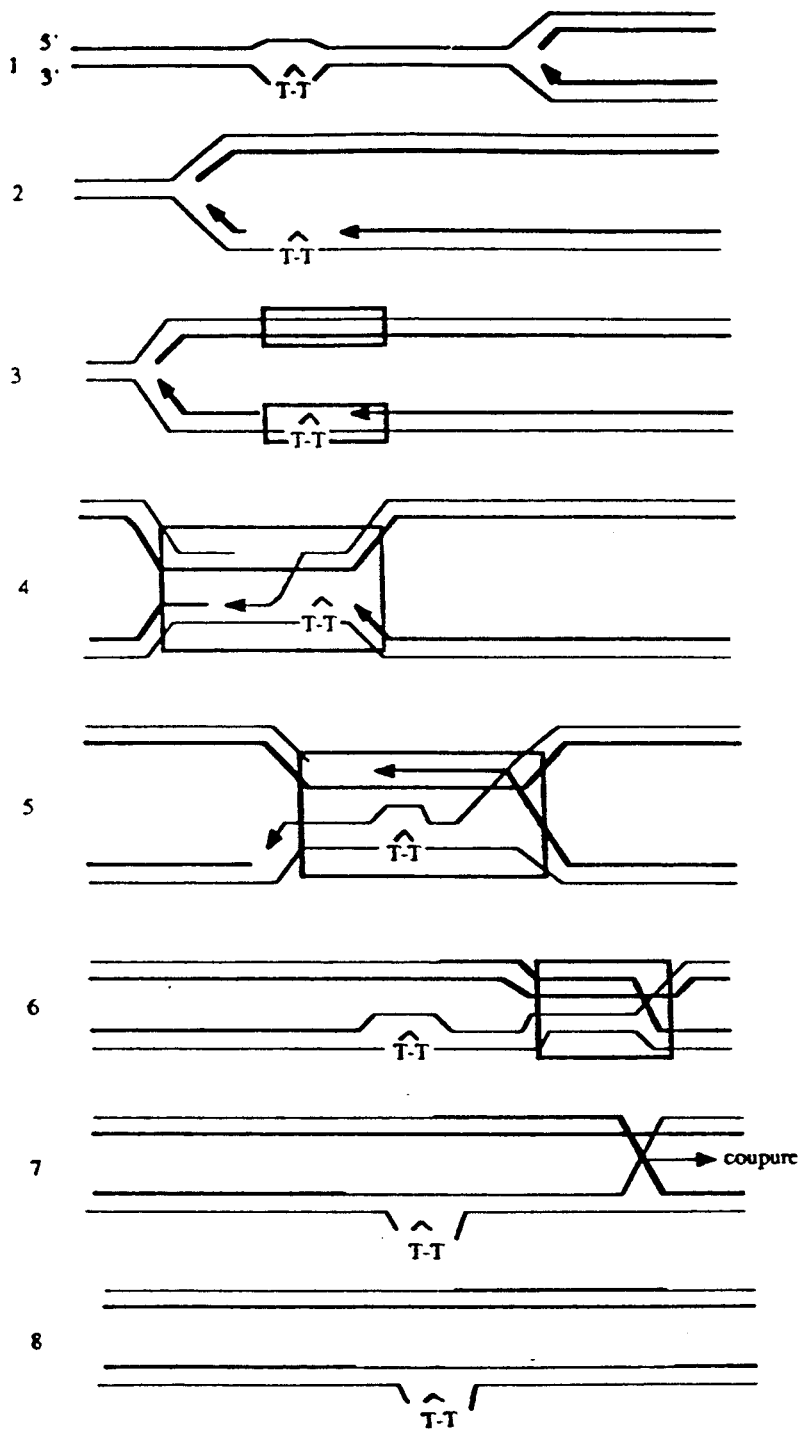


Figure 6 : Modèle de recombinaison post-réplivative

la fourche répliquative (Moore *et al.*, 1981; Schaaper *et al.*, 1983; Yoshida *et al.*, 1984; Berger & Edenberg, 1986). La cellule dont la réplication est bloquée peut alors mettre en route deux types de processus qui lui permettent de «tolérer» la lésion en créant éventuellement une mutation.

2.2.1. Recombinaison post-répliquative (Fig.6)

Lorsque la réplication de l'ADN est bloquée par une lésion non codante, elle peut être réinitiée 1000 nucléotides plus loin environ, d'où l'apparition d'une région simple brin (ADNsb) en aval de la lésion (2). Certaines protéines cellulaires, appelées RecA (pour recombinaison) présentent une forte affinité pour l'ADN simple brin et viennent se fixer sur cette région à raison d'une molécule RecA pour 3 à 5 nucléotides (3). Cette fixation coopérative est ordonnée par la protéine SSB (*Single-Stranded Binding Protein*) qui stabilise le complexe ADNsb-RecA et permet la formation d'un long filament de structure hélicoïdale. Ce complexe vient s'apparier avec le duplex homologue intact formé au cours de la réplication du brin non endommagé (4). A ce niveau, une endonucléase semble agir et créer une extrémité libre capable d'initier un échange de brins entre le duplex intact et le brin endommagé (activité *Cutting in trans*). Le duplex donne son brin complémentaire de la région simple brin et l'autre brin sert de matrice à l'ADN polymérase qui resynthétise un duplex intact à partir de l'extrémité libre (5). Après ligation et migration du complexe, il apparaît une structure particulière appelée *jonction de Holliday* (6-7). Cette jonction est alors «résolue» par une résolvasse capable de couper et de religuer les 4 brins avec restitution des deux duplex linéaires (8) (Howard-Flanders *et al.*, 1984; Moreau, 1985, Cox, 1987; Conley & West, 1989).

Toutes les protéines impliquées dans ce processus ne sont pas connues mais les produits des gènes *recB*, *recC* et *recD* semblent intervenir dans les stades précoces (Wang & Smith, 1983). Ce phénomène de recombinaison appelé autrefois «réparation post-répliquative» n'a rien d'une réparation puisque la lésion subsiste sur un des deux duplex (8). En fait, il s'agit essentiellement du moyen trouvé par la cellule pour que la réplication puisse continuer et que la lésion résiduelle se retrouve dans une région double brin. Cette lésion peut alors être excisée par le système UvrABC alors qu'elle n'était plus réparable au niveau de la fourche répliquative bloquée (Sancar & Sancar, 1988).

2.2.2. Induction du système SOS : mutagénèse

Le blocage de la fourche répliquative peut également provoquer l'apparition d'un

Tableau I. Gènes SOS bactériens

Gene	Fonction
<i>lexA</i>	Répresseur des gènes <i>din</i>
<i>recA</i>	Clivage de LexA et UmuD, recombinaison, réparation, mutagénèse SOS, recombinaison RecF-dépendante
<i>uvrA</i>	Réparation par excision
<i>uvrB</i>	Réparation par excision
<i>uvrC</i>	Réparation par excision
<i>umuC</i>	Mutagénèse SOS
<i>umuD</i>	Mutagénèse SOS
<i>recN</i>	Recombinaison RecF-dépendante
<i>recQ</i>	Recombinaison RecF-dépendante
<i>ruvA</i>	Recombinaison RecF-dépendante, réparation
<i>himA</i>	Recombinaison site-spécifique
<i>sfiA (sulA)</i>	Filamentation, inhibition de la division cellulaire
<i>dinA</i>	?
<i>dinB</i>	?
<i>dinD</i>	?
<i>dinF</i>	?
?	Inhibition de la respiration
?	Réplication stable

signal intracellulaire capable d'induire un ensemble de fonctions physiologiques regroupées sous le terme de «fonctions SOS» ou «système SOS». Ce système de sauvegarde se manifeste entre autres, par l'inhibition de la division cellulaire, l'augmentation de la réparation par excision, de la recombinaison et de la mutagénèse, l'induction lysogénique de certains prophages et même, si le sauvetage est impossible, la mort de la cellule par arrêt de la respiration (pour revues : Walker G., 1984; D'ari, 1985). Jusqu'à présent, une vingtaine de gènes responsables de ces fonctions (également appelés gènes *din* pour *damage inductible*) a été identifiée (Tableau I). L'induction de l'expression de ces gènes est sous le contrôle du produit de deux d'entre eux : le gène *recA*, codant pour RecA, déjà impliquée dans la recombinaison et qui joue ici le rôle d'effecteur de la régulation; le gène *lexA*, codant pour la protéine LexA qui réprime la totalité des gènes *din*, y compris *recA* et *lexA*, dans les cellules non induites. La répression se fait par fixation de LexA sur la région promotrice des gènes *din* et plus particulièrement au niveau de séquences appelées *LexA-Boxes* ou *SOS-Boxes* («boîtes LexA ou SOS»).

Lorsque l'ADN est endommagé et que la fourche répliquative est bloquée, il y a apparition d'un signal inducteur capable d'activer RecA qui est présente de manière constitutive dans la cellule, mais à faible niveau. La nature de ce signal n'est pas connue mais il a été démontré qu'*in vitro*, la présence d'ATP et de fragments d'ADN simple brin est suffisante à l'activation de RecA (Craig & Roberts, 1980 et 1981). *In vivo*, les régions

simples brins qui apparaissent au niveau des fourches répliquatives bloquées semblent être un bon modèle de signal inducteur. Les molécules RecA peuvent s'y accrocher, fixer l'ATP et devenir activées (RecA*). C'est sous cette forme de complexe ADNsb-RecA*-ATP que RecA* assure son rôle d'effecteur de la régulation en interagissant avec LexA qui se clive et devient inactive (Fig.7) (Little *et al.*, 1980; Walker G., 1984). On a longtemps attribué une activité protéolytique à RecA* mais il semble maintenant admis que LexA est capable de s'auto-cliver, RecA* ne servant que de catalyseur (Little, 1984; Siliaty & Little, 1987). Le même schéma peut d'ailleurs s'appliquer au répresseur du phage λ qui présente une homologie de séquence peptidique avec le site de clivage de LexA; ceci explique que l'induction du prophage d'une souche lysogénique fasse également partie de la réponse SOS (Little & Mount, 1982).

LexA clivée donne deux polypeptides inactifs; il en résulte une dérepression en cascade de l'ensemble des gènes *din*. La réparation des lésions est alors fortement augmentée, principalement par excision-resynthèse grâce au produit des gènes *uvrA*, *B* et *D* (système UvrABC). Certains mécanismes de recombinaison complexes et mal connus peuvent également intervenir et nécessitent le produit de gènes *din* tels que *recA*, *recN* et *recQ*, *uvrA* et *B* (Cox & Lehman, 1982; Rostas *et al.*, 1987; Madijaru *et al.*, 1988) et/ou d'autres gènes

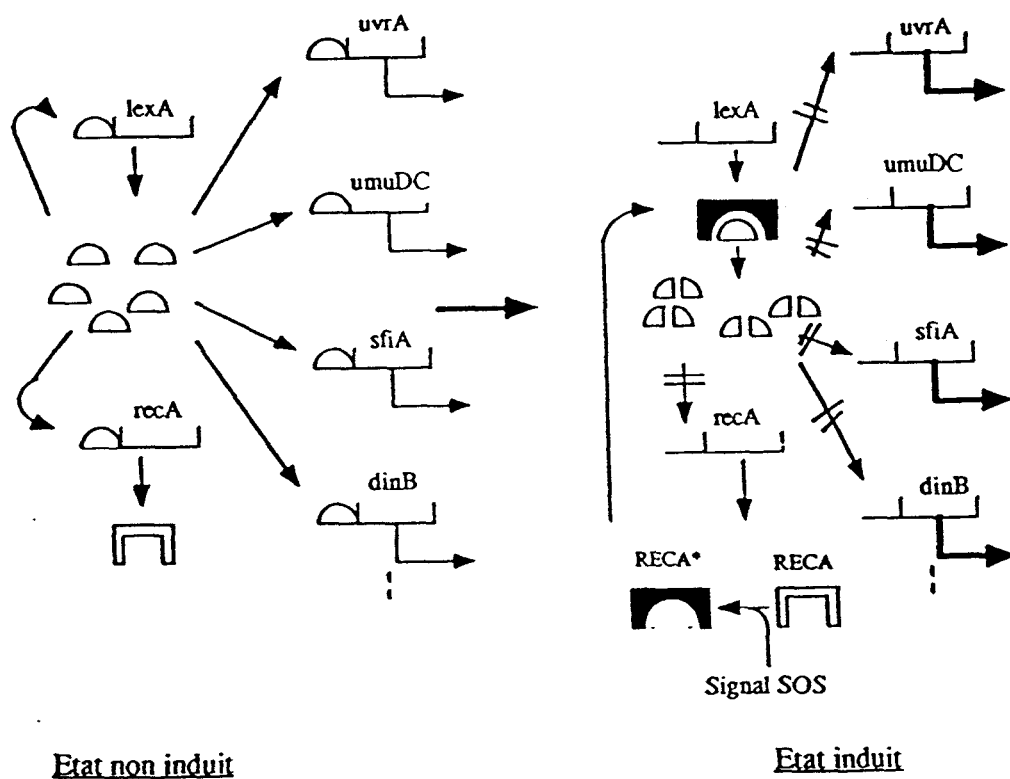


Figure 7 : Régulation du système SOS (d'après Walker, 1985)

non SOS-induits tels que *recB*, *recC*, *recD*, *recF*, *recJ* et *recO* (Smith & Hays, 1985; Lloyd *et al.*, 1988; Braedt & Smith, 1989). Comme nous allons le détailler plus loin, les lésions bloquant les fourches répliquatives peuvent également être tolérées et ceci grâce à l'intervention des produits de certains gènes SOS capables d'interagir avec la machinerie répliquative; le réplisome peut alors incorporer un nucléotide erroné ou non face à la lésion et poursuivre l'élongation. Si la base incorporée n'est pas légitime, il en résulte une mutation de l'ADN face à la lésion.

Réparation et tolérance des lésions font disparaître les signaux inducteurs; RecA libre n'est plus activée et les molécules LexA nouvellement synthétisées et intactes peuvent à nouveau réprimer l'ensemble du système.

Jusqu'à présent, on ne connaît que quatre gènes *din* directement impliqués dans la mutagenèse induite par les UV ou certains cancérigènes chimiques comme le 4NQO. Il s'agit des gènes *recA*, *lexA* et des deux gènes *umuC* et *umuD* regroupés en opéron *umuDC* (Kato & Shinoura, 1977; Steinborn, 1978). Pendant longtemps, seuls les produits de l'opéron *umuDC* étaient connus comme responsables directs de l'apparition des mutations et cela en agissant sur l'ADN polymérase. Cette interaction inhiberait l'activité 3'-5' exonucléasique de correction des erreurs (*proofreading*) de l'enzyme et lui permettrait d'incorporer une base erronée face à la lésion (Radman, 1975). Mais plus récemment, il a été démontré que RecA* (activée) pouvait, elle aussi, avoir un rôle direct dans la mutagenèse. En effet, si une souche *lexA(Def)* (qui ne contient plus de répresseur LexA et dont les fonctions SOS sont exprimées constitutivement) porte également la mutation *recA430* (allèle non activable de RecA), on n'observe plus de mutagenèse induite par les UV malgré l'expression de l'opéron *umuDC* (Blanco *et al.*, 1982; Ennis *et al.*, 1985). D'autre part, RecA* est capable d'inhiber *in vitro* l'activité *proofreading* de l'ADN Polymérase III en se fixant sur sa sous-unité ϵ (Fersht & Knill-Jones, 1983; Lu *et al.*, 1986; Shwartz *et al.*, 1988); il en résulte une baisse de la fidélité de répliquaison de l'enzyme. Certains auteurs ont donc défini le second rôle de RecA* (en plus de l'inactivation de LexA) comme étant sa fixation directe sur la machinerie répliquative bloquée et l'incorporation d'une base erronée ou non qu'elle autorise face à la lésion (Bridges & Woodgate, 1985; Ennis *et al.*, 1985).

Mais les protéines UmuC et D n'en restent pas moins indispensables à la mutagenèse. En effet, des souches mutées sur *umuC* ou sur *umuD* présentent toutes le même phénotype à savoir une non mutabilité par certains mutagènes tels que les UV ou le 4NQO (Kato & Shinoura, 1977; Steinborn, 1978). De plus, la surproduction artificielle de ces protéines dans la cellule peut entraîner le blocage de la répliquaison; elles semblent donc capables de s'associer à l'ADN polymérase (Marsh & Walker, 1985). En 1984, Bridges et Woodgate ont proposé un modèle où UmuC et D permettraient la réinitiation de la répliquaison

à partir de l'amorce créée face à la lésion par RecA* (Bridges & Woodgate, 1984).

Récemment enfin, se basant sur l'homologie de séquence peptidique entre LexA et UmuD (Perry *et al.*, 1985), plusieurs équipes ont démontré qu'en présence d'UmuC, RecA* est également capable de catalyser l'autoclivage d'UmuD. UmuD clivée et UmuC seraient alors les formes actives pour la mutagenèse (Buckhardt *et al.*, 1988; Nohmi *et al.*, 1988; Shinagawa *et al.*, 1988).

De l'ensemble de ces résultats se dégage un modèle de mutagenèse dont certaines étapes demandent encore confirmation et où l'on distingue (Wood & Sedgwick, 1986; Nohmi *et al.*, 1988) (Fig.8) :

- l'activation de RecA en RecA* qui permet le clivage de LexA et l'expression de l'opéron *umuDC*
- le second rôle de RecA* avec intervention directe au niveau du réplisome et incorporation d'une base erronée face à la lésion par inhibition de l'activité *proofreading* de l'ADN polymérase
- la fixation du complexe UmuD-UmuC sur la polymérase puis le clivage de UmuD catalysé par RecA* ce qui permet la reprise de la réplication à partir de la mutation créée

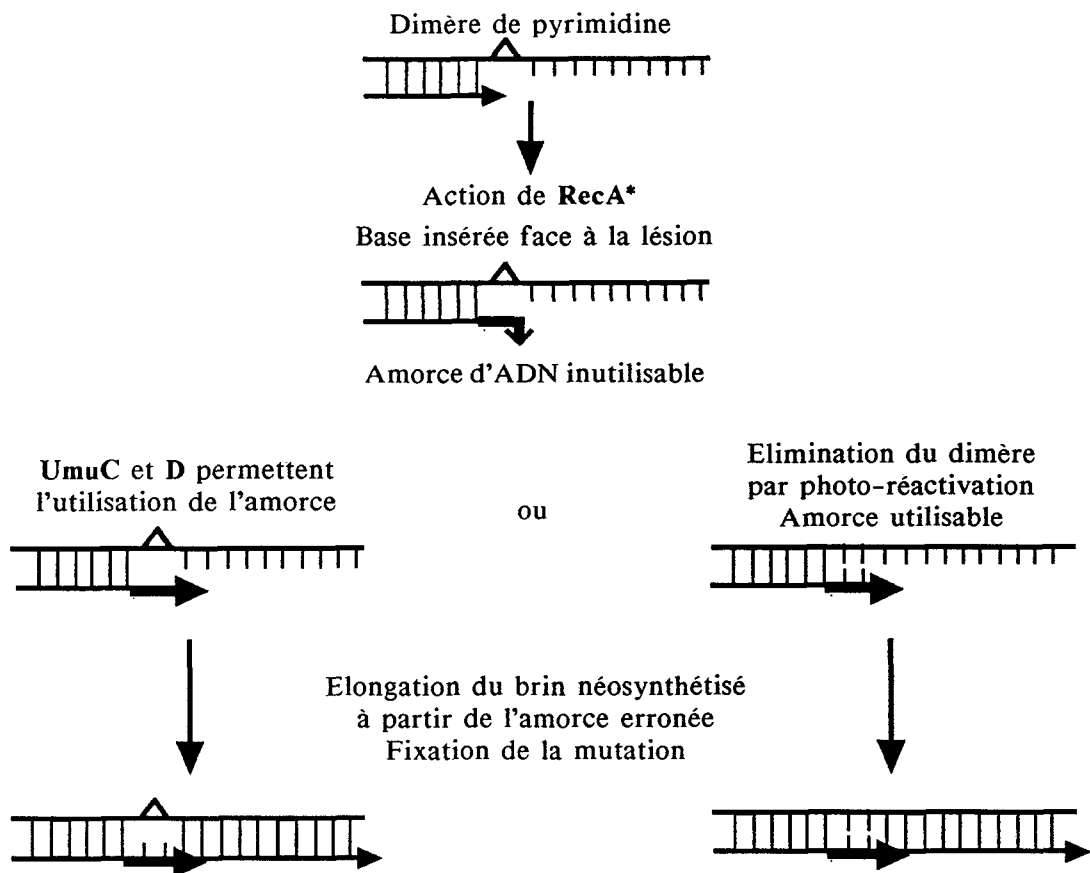


Figure 8: Rôle de RecA*, UmuC et UmuD dans la mutagenèse induite par les UV (d'après Wood & Sedgwick, 1986).

La fourche répliquative peut alors reprendre sa progression mais la lésion est toujours présente sur l'ADN parental; la mutation créée sur le brin néosynthétisé face à cette lésion sera définitivement fixée dans le génome par la réplication de ce brin, soit au cours du cycle cellulaire suivant, soit après excision de la lésion résiduelle par le système UvrABC.

Modifier son génome peut être dangereux pour la cellule; pour éviter cela, elle dispose d'un système plus fin de régulation des fonctions SOS et notamment de la fonction mutagène associée à *umuDC*. En effet, l'affinité du repressur LexA est beaucoup plus forte pour le promoteur de l'opéron *umuDC* que pour celui des autres gènes *din* en particulier des gènes du système UvrABC (Walker G., 1984). De plus, l'expression d'*umuDC* est faible, même dans la cellule pleinement induite et la demi-vie des protéines codées est relativement courte (Nohmi *et al.*, 1988). Enfin, le clivage d'UmuD catalysé par RecA* semble beaucoup moins efficace que celui de LexA (Burckhardt *et al.*, 1988). Le phénomène de mutagenèse semble donc nécessiter la pleine induction des fonctions SOS et n'être utilisé qu'en dernier ressort par la cellule pour échapper à certaines agressions qui peuvent lui être fatales.

En ce qui concerne la nature des mutations créées sur l'ADN, on constate que les précancérogènes sont à l'origine d'une mutagenèse très variée. Alors que les agents alkylants sont spécifiques des substitutions d'une guanine par une adénine (*miscoding*), un même précancérogène peut généralement induire plusieurs types de mutations. Il peut s'agir de délétions ou d'additions (d'une ou de plusieurs bases) ou de substitutions qui sont soit des transitions (d'une purine en purine ou d'une pyrimidine en pyrimidine), soit des transversions (d'une purine en pyrimidine ou l'inverse). Les précancérogènes sont capables de former différentes lésions sur l'ADN et il semble que toutes n'aient pas le même pouvoir mutagène ni la même spécificité mutationnelle. Dans le cas général, il est impossible d'obtenir un seul type de lésion sur l'ADN; c'est pourquoi actuellement, on dispose encore de très peu d'informations sur la nature des mutations induites spécifiquement par un adduit volumineux.

Une des seules études ayant permis d'analyser les conséquences de la formation d'un seul type de lésion a été effectuée sur chacun des deux adduits formés en C8 de la guanine par le N-AAF : le C8-AF et le C8-AAF. Ceci a été possible grâce à l'utilisation de deux modèles de cancérogènes ultimes, le N-OH-AF et le N-Aco-AAF, chacun conduisant à la formation d'un type d'adduit.

Pour l'adduit C8-AAF, la mutagenèse induite est spécifique des délétions -G ou -GC selon la séquence nucléotidique où se fixe le cancérogène (Koffel-Schwartz *et al.*, 1984). Le C8-AF au contraire, est spécifique des substitutions de paires de bases, en particulier des transversions G en T (Bichara & Fuchs, 1985). Pour le N-AAF il semble donc possible d'attribuer un type de mutation à un type de lésion formée. Cette situation n'est cependant

pas généralisable à tous les précancérogènes; c'est en effet ce qui ressort de l'étude effectuée sur le GluP3 (3-amino-4,6-diméthylpyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole), un des cancérogènes contenus dans le produit de pyrolyse des protéines; l'adduit formé est présent en C8 de la guanine et peut induire aussi bien des délétions (-G) que des substitutions (G en A) (Hebert *et al.*, 1988). Il apparaît donc que certaines lésions sont spécifiques d'un type de mutation (C8-AF, C8-AAF) alors que d'autres induisent des mutations de nature différente (GluP3).

Pour le 4NQO, la mutagénèse a été précédemment étudiée chez le Procaryote par traitement de la bactérie avec le 4NQO ou le 4HAQO (Ishizawa & Endo, 1971; Ames *et al.*, 1973; Prakash *et al.*, 1974; Coulondre & Miller, 1977-b); l'ADN génomique porte alors plusieurs types d'adduits dont probablement le N2-G (50%), le C8-G (30%) et le N6-A (15%). D'après ces études, le 4NQO induirait principalement des transitions G en A mais aussi des délétions de guanines; les transversions G en T et G en C ont été rarement obtenues. On peut donc penser que l'adduit N6-A n'est pas mutagène mais il reste impossible d'appréhender le rôle de chacune des lésions dans la mutagénèse observée. Déterminer la nature des mutations induites par chaque adduit du 4NQO et tenter d'acquérir une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires de mutagénèse font partie des objectifs du travail présenté ici.

VI. PRESENTATION DU TRAVAIL

La plupart des études biologiques effectuées jusqu'à présent sur les cancérogènes chimiques ont toujours été limitées aux conséquences de l'action du cancérogène en général, sans pouvoir tenir compte de la diversité des adduits qui se forment sur l'ADN ni de la réponse cellulaire spécifique à chacun de ces adduits. Cette limitation provient parfois du manque d'informations sur la nature et la structure des lésions formées, mais surtout de l'impossibilité d'induire un seul type d'adduit sur l'ADN. Dans le cas du 4NQO, un modèle de cancérogène ultime a été mis au point au laboratoire : l'Ac-4HAQO. Ce composé est capable de modifier l'ADN *in vitro* et son utilisation a permis de déterminer la nature et la structure des différents adduits du 4NQO.

Nous nous proposons maintenant d'étudier les conséquences biologiques de la formation de chacune des lésions du 4NQO, en particulier des adduits N2-G et C8-G. Nous tenterons de déterminer leur toxicité et leur mutagénicité respectives mais aussi la nature des mutations qu'ils induisent et les mécanismes moléculaires provoquant l'apparition de ces mutations.

Une des seules études moléculaires de ce type est celle effectuée sur les deux adduits formés en C8 de la guanine par le N-AAF et cela grâce à l'utilisation des deux modèles de

cancérogènes ultimes décrits précédemment; l'utilisation de l'un ou de l'autre pour modifier l'ADN *in vitro* permet d'obtenir la lésion que l'on désire étudier. Les conséquences conformationnelles et biologiques de la formation des adduits C8-AF et C8-AAF sont maintenant parfaitement caractérisées et ces résultats constituent en fait les rares outils de comparaison dont nous disposons pour notre étude.

Pour le 4NQO, la situation est différente de celle du N-AAF puisque tous les adduits sont formés à partir du même cancérogène ultime. Pour étudier l'adduit désiré, nous devons utiliser la propriété qu'a le noyau quinoléine de se fixer préférentiellement en N2 ou en C8 de la guanine suivant l'état conformationnel de l'ADN utilisé pour la modification chimique. En effet, sur l'ADN double brin superenroulé et à 37°C, la modification est comparable à celle obtenue *in vivo* avec 50% de N2-G. Au contraire, sur l'ADN simple brin et à 37°C, on obtient environ 80% d'adduits C8-G. Afin d'étudier spécifiquement chaque adduit, notre premier travail a été d'améliorer cette fixation préférentielle du cancérogène soit en N2, soit en C8 de la guanine. La technique mise au point pour cela n'est en fait que «l'outil» nécessaire à notre étude. Cet objectif atteint, il nous a été possible d'appliquer cette technique au système de mutagenèse en avant décrit ci-dessous et qui nous a permis d'appréhender certaines propriétés biologiques des adduits du 4NQO.

A. MODELE UTILISE

1. Description

Pour cette étude, nous utilisons le modèle de mutagenèse en avant mis au point chez *E.coli* par Fuchs en vue d'étudier les principaux adduits du N-AAF (Fuchs *et al.*, 1981).

Ce système de mutagenèse utilise le plasmide pBR322 qui peut être modifié *in vitro* par le modèle de cancérogène ultime, l'Ac-4HAQO (Fig.9). Le plasmide modifié est utilisé pour transformer *E.coli* dont les fonctions SOS auront été ou non induites au préalable. Après transformation bactérienne, le plasmide confère un nouveau phénotype à la bactérie puisqu'il porte les gènes de résistance à l'ampicilline (Ap) et à la tétracycline (Tc). Le gène Ap est utilisé comme marqueur de transformation : sélection et numérations ne se font que sur les bactéries devenues résistantes à l'ampicilline (Ap^R). Le gène Tc est pris comme support d'étude ou cible de mutagenèse : le repiquage individuel des transformants Ap^R sur un milieu contenant de la tétracycline permet l'isolement des clones sensibles à cet antibiotique (Ap^RTc^S); ces clones contiennent un plasmide dont le gène Tc aura été muté au cours de la réplication.

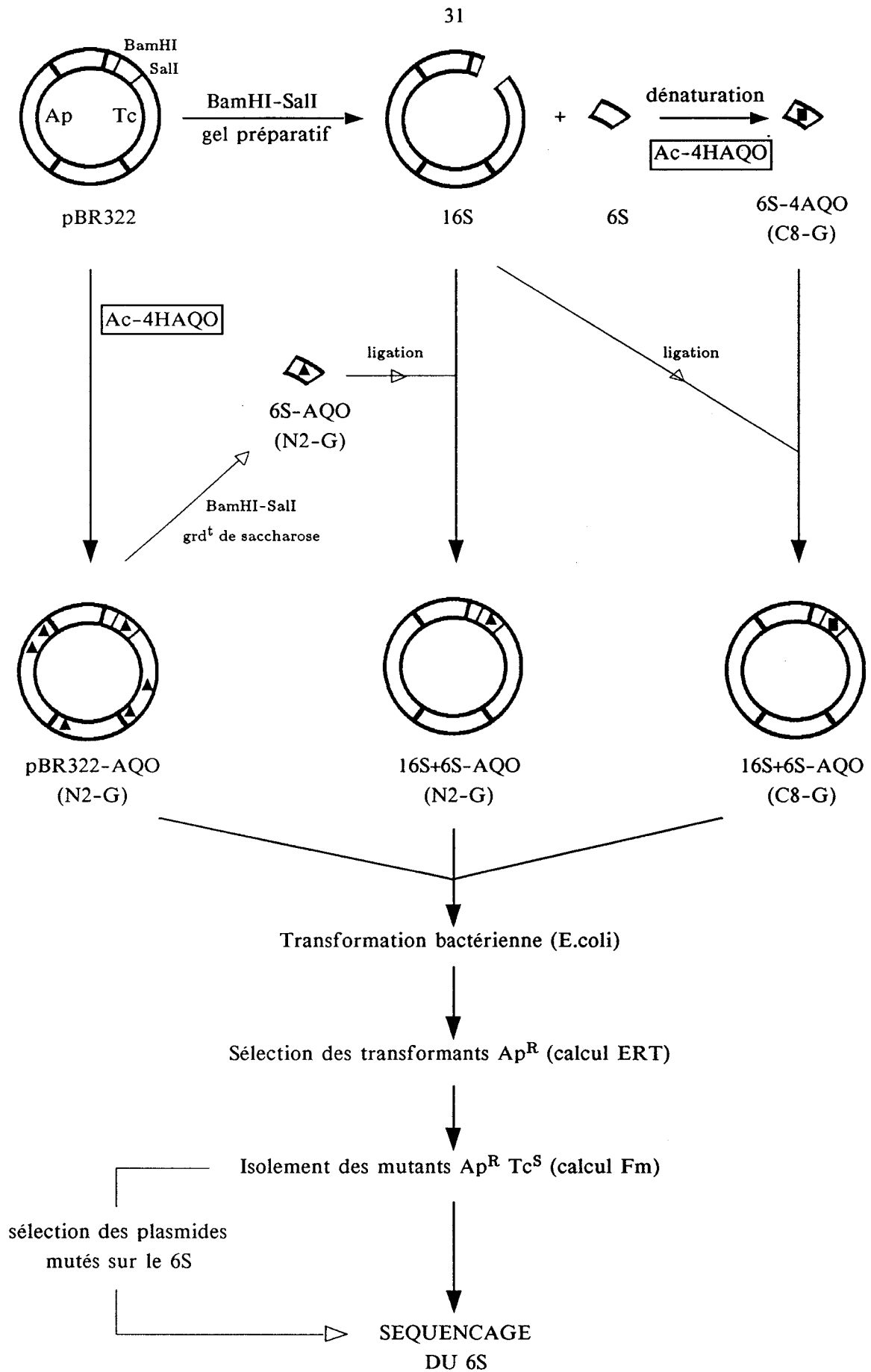


Figure 9 : modèle de mutagenèse en avant (adapté de Fuchs *et al.*, 1981)

2. Avantages

Ce modèle est d'utilisation simple et présente plusieurs avantages :

- la modification du plasmide par le cancérigène se fait *in vitro*; ceci permet de contrôler les paramètres de la réaction et de modifier l'ADN sous forme native (superenroulé) ou dénaturée afin d'obtenir une fixation préférentielle du noyau quinoléine soit en N2, soit en C8 de la guanine. De plus, l'utilisation du cancérigène ultime tritié, l'Ac-4HA[2-³H]QO permet de déterminer le nombre d'adduits par plasmide.

- le choix d'*E.coli* comme bactérie réceptrice permet de disposer de nombreuses souches mutantes pour certains gènes des fonctions SOS tels que *uvrA*, *uvrC* ou *umuC*. De plus, l'induction des fonctions SOS de l'hôte se fait facilement, par simple irradiation UV des bactéries avant transformation bactérienne.

- le pBR322 (4360 paires de bases) possède en début de gène Tc, deux sites de restriction BamHI et Sall qui délimitent un fragment de restriction de 276 paires de bases (fragment 6S), facilement séparable du reste de la molécule (fragment 16S). Les fragments 6S mutés sont facilement séquençables, ce qui nous permet de déterminer la nature et la localisation des mutations induites par l'adduit étudié.

De plus, ce modèle est particulièrement bien adapté à notre étude. En effet, il permet de détecter tous les types de mutations : additions, délétions ou substitutions. Effectivement, l'activité de la protéine codée par le gène Tc est particulièrement sensible à tout changement d'acide aminé, même conservatif; cette sensibilité du système est d'ailleurs confirmée par les résultats obtenus avec les adduits du N-AAF et du GluP3 puisque tous les types de mutation ont pu être détectés (Koffel-Schwartz *et al.*, 1984; Bichara & Fuchs, 1984; Hebert *et al.*, 1988).

B. METHODES UTILISEES

Au cours de cette étude, deux méthodes ont été utilisées (Fig.9) :

- la modification du plasmide entier, sous forme superenroulée
- la modification ciblée sur le fragment 6S du plasmide

1. modification du plasmide entier

Sur la forme superenroulée du plasmide entier, la fixation du cancérigène ultime

se fait préférentiellement en N2 de la guanine. Cette méthode sera la plus utilisée au cours de ce travail.

Après transformation bactérienne par un plasmide entièrement modifié et portant un nombre déterminé d'adduits, la numération des transformants Ap^R permet de calculer une efficacité relative de transformation par rapport au plasmide témoin non modifié. Cette valeur permet d'estimer la toxicité des adduits présents sur le pBR322, ce qui traduit l'aptitude de ces lésions à bloquer la réplication du plasmide. Après repiquage des transformants et criblage des mutants Ap^RTc^S, il est possible de calculer la fréquence de mutation (mutants isolés/transformants testés), ce qui permet de connaître la mutagénicité de la lésion. Grâce à une technique de cartographie par délétion (voir Matériel et Méthodes), on sélectionne les plasmides portant leur mutation sur le fragment 6S; ce fragment est alors séquencé et l'on peut déterminer la nature et l'emplacement de la mutation induite par l'adduit considéré.

2. Modification ciblée sur le fragment 6S

Dans ce cas, le fragment 6S modifié par l'Ac-4HAQO est reliqué au fragment 16S non modifié; le plasmide reconstitué est alors utilisé comme précédemment. Les mutants Ap^RTc^S sélectionnés en fin d'expérience portent obligatoirement leur mutation sur le fragment 6S et sont directement séquençables; la cartographie par délétion n'est pas nécessaire.

Cette méthode sera essentiellement utilisée pour l'étude de la mutagénèse induite par l'adduit C8-G. Pour cela, le fragment 6S purifié aura été dénaturé avant modification chimique et la fixation du cancérrogène se fera principalement sur le C8 de la guanine.

La modification ciblée sur le 6S sera également appliquée, mais de façon ponctuelle, à l'étude de la mutagénèse induite par le N2-G. Dans ce cas, le fragment 6S portant les adduits et utilisé pour la ligation provient d'un plasmide modifié sous sa forme superenroulée.

C. OBJECTIFS

Le contrôle de la fixation du cancérrogène en N2 ou en C8 de la guanine et l'utilisation d'un modèle de mutagénèse en avant nous permettent maintenant d'étudier les conséquences biologiques de la formation des deux principaux adduits du 4NQO, le N2-G et le C8-G. Dans un premier temps, nous estimerons la toxicité respective de ces lésions, toxicité qui traduit leur aptitude à bloquer la fourche répliative du plasmide; nous tenterons

d'établir une corrélation entre le blocage de l'élongation et la déformation conformationnelle de la double hélice d'ADN que peuvent induire ces deux adduits. La toxicité observée dans des souches déficientes pour l'excision des lésions devrait nous permettre d'obtenir quelques informations sur la réparation des adduits du 4NQO.

Après avoir déterminé si la mutagenèse induite nécessite la présence des fonctions SOS de l'hôte, l'étude de la mutagenicité des lésions nous permettra d'estimer la capacité de chaque adduit à être converti en mutation. Il nous sera alors possible de savoir si les différents adduits du 4NQO ont le même rôle et la même importance dans la mutagenèse induite *in vivo* par le 4NQO. Nous tenterons également de déterminer la nature des mutations induites spécifiquement par chaque adduit. L'étude de la séquence nucléotidique où apparaissent ces mutations devrait nous permettre de proposer certains mécanismes moléculaires de conversion des lésions prémutagènes du 4NQO en mutation.

De l'ensemble de ces études et par comparaison des résultats du N2-G et du C8-G, il sera possible d'analyser l'influence du site de fixation d'un cancérigène sur les propriétés biologiques et moléculaires de ce composé; de plus, en nous référant aux résultats obtenus sur le C8-AF et le C8-AAF, nous pourrons comparer les propriétés de 3 adduits formés sur la même base et sur le même atome mais dont la molécule de cancérigène diffère. Enfin, il faut souligner que ce travail est d'autant plus intéressant qu'il permet d'étudier une lésion de type N2 induite par une amine aromatique, ce qui n'avait jamais été possible jusqu'à présent.

DEUXIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSION

I. MODIFICATION CHIMIQUE DE L'ADN EN N2 OU EN C8 DE LA GUANINE

Notre premier travail a été de préparer des ADN modifiés soit en N2 soit en C8 de la guanine. La technique utilisée pour cela est en fait un outil nécessaire pour différencier les deux principaux adduits du 4NQO.

In vivo, la fixation du cancérogène sur l'ADN se fait à 50% sur l'azote 2 de la guanine, l'adduit dGuo-N2-AQO (adduit N2-G) étant l'adduit majeur du 4NQO. Les autres modifications de l'ADN se font à 30% sur le carbone 8 de la guanine (adduit dGuo-C8-AQO ou C8-G) et à 15% sur l'azote 6 de l'adénine (adduit dAdo-N6-AQO ou N6-A) (Bailleul *et al.*, 1981, Galiègue-Zouitina *et al.*, 1985 et 1986).

En utilisant le modèle de cancérogène ultime qu'est l'Ac-4HAQO, la fixation préférentielle de la quinoléine en N2 de la guanine nécessite l'utilisation d'ADN double brin; *in vitro*, la proportion des différents adduits obtenus à 37°C est alors comparable à celle observée *in vivo*. Par contre, sur l'ADN simple brin la fixation de la quinoléine se fait préférentiellement en C8 de la guanine (75%) (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1984).

Dans le but d'améliorer la fixation en N2, différents essais de modification ont été réalisés à faible force ionique (TE 0,25X) et pour différentes températures de réaction (37°C, 0°C et -10°C). De même pour la fixation en C8, la modification de l'ADN dénaturé a été réalisée soit à 37°C immédiatement après dénaturation, soit à 95°C.

L'analyse des hydrolysats enzymatiques d'ADN modifiés est effectuée par chromatographie liquide à haute pression (CLHP). Les profils d'élution obtenus à 365nm sont caractéristiques de la modification (voir Matériel et Méthodes, Fig.15, p.83) et permettent de calculer la proportion de chaque adduit pour les différentes conditions expérimentales de réaction (Tableau II).

Alors que la modification du plasmide natif à 37°C respecte la proportion des adduits *in vivo* (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1985), celles effectuées à 0°C et -10°C permettent de disposer d'ADN plasmidiques comportant respectivement 70 et 80% d'adduits N2-G; parallèlement, la proportion d'adduits C8-G et N6-A diminue de moitié à -10°C par rapport à 37°C. A basse température, la réactivité de l'Ac-4HAQO est cependant moins forte pour l'ADN qu'à 37°C et le nombre d'adduits sur le plasmide est moins important (environ 4 fois). Cette baisse de réactivité peut être compensée partiellement en augmentant le rapport DiAc-4HAQO/ADN (voir Matériel et Méthodes); la proportion des différents adduits reste la même.

Sur l'ADN simple brin, la modification à 95°C permet d'obtenir 90% de C8-G; les adduits N6-A ne représentent plus que 4% de la modification totale et les adduits N2-G ne sont pratiquement plus formés.

Tableau II. Proportion des principaux adduits du 4 NQO en fonction de la température de modification chimique et de l'état conformationnel de l'ADN.

	Température (°C)	N 2 - G (%)	C 8 - G (%)	N 6 - A (%)
ADN superenroulé	37	52	27	15
	0	70	17	10
	-10	80	10	6
ADN simple brin	37	3,5	75	19
	95	2	90	4

La fixation du cancérogène sur le C8 ou le N2 de la guanine est le résultat de la réaction de l'espèce électrophile sous deux formes tautomériques (Fig.2, p.10); en effet, après activation du 4NQO *in vivo* ou *in vitro*, le cancérogène ultime perd son séryle ou son acétyle pour former un ion nitrénium en équilibre avec un carbénium. Par substitution de l'hydrogène en C8 de la guanine, l'ion nitrénium conduit à l'adduit C8-G; l'ion carbénium réagit lui sur les azotes 2 de la guanine ou 6 de l'adénine pour former les adduits N2-G et N6-A (Galiègue-Zoutina *et al.*, 1986; Demeunynck *et al.*, 1986). A 37°C, la fixation du carbénium en N2 est favorisée et l'adduit N2-G est formé à 50%. A basse température, la réactivité globale de l'espèce électrophile vis-à-vis de l'ADN semble diminuer mais la fixation préférentielle du carbénium sur l'azote 2 de la guanine est encore plus marquée puisque l'on peut alors obtenir jusqu'à 80% d'adduits N2-G.

La structure tertiaire de l'ADN doit cependant jouer un rôle prédominant dans l'orientation de la réaction, probablement en modifiant l'électronégativité et/ou l'accessibilité de ses atomes, en particulier N2 et C8 de la guanine. Il a déjà été démontré que les agents électrophiles réagissent différemment sur la guanine lorsque celle-ci est libre ou dans un ADN simple brin; en effet, l'adduit C8-G n'est obtenu majoritairement que sur l'ADN dénaturé et, lorsque l'on modifie de la désoxyguanosine par l'Ac-4HAQO, seul l'adduit dGuo-C8-AQO est formé (Bailleul *et al.*, 1981). Le même phénomène a été décrit pour d'autres cancérogènes. C'est le cas des deux énantiomères du benzopyrène-diol-époxyde I

où un adduit guanine mineur est formé en plus grande proportion sur l'ADN dénaturé (Pulkrabek *et al.*, 1979). De même avec le N-acétoxy-N-acétylaminofluorène (N-Aco-AAF), on obtient *in vitro* les 2 adduits dGuo-N2-AAF (N2-AAF) et dGuo-C8-AAF (C8-AAF) sur l'ADN natif (Kriek, 1972) alors que sur l'ADN dénaturé, seul l'adduit C8-AAF est formé (Fuchs, 1978).

En utilisant le modèle de cancérogène ultime *in vitro*, nous sommes donc capables de maîtriser le nombre et la proportion des adduits du 4NQO. Ce résultat nous permet maintenant d'étudier chacun des deux principaux adduits : le N2-G et le C8-G. En effet, nous allons pouvoir dissocier leurs effets, en particulier au niveau de la toxicité, de la mutagénicité mais également de la nature des mutations induites par ces deux lésions. Indirectement, nos résultats devraient aussi apporter certaines informations sur l'adduit mineur N6-A.

Cette approche est d'autant plus intéressante qu'elle permet l'étude d'une lésion de type N2 induite par une amine aromatique, ce qui semble ne pas être possible pour le N-Aco-AAF; en effet, l'adduit N2-AAF est mineur et la fixation préférentielle sur l'azote 2 de la guanine n'est pas réalisable actuellement.

L'adduit N2-G est directement impliqué dans l'appariement de bases G:C, probablement dans le petit sillon de la double hélice, alors que le C8-G semble se trouver dans le grand sillon; Cette étude des lésions induites par un même cancérogène sur une même base mais en 2 sites différents de la guanine est donc très intéressante : elle nous permettra d'analyser l'influence du site de fixation du cancérogène sur les conséquences biologiques de la modification de l'ADN.

II. TOXICITE ET REPARATION DES ADDUITS DU 4NQO

A. TOXICITE

Lorsque l'on utilise un plasmide modifié par un cancérogène pour transformer une bactérie, on observe une diminution plus ou moins forte de la proportion de transformants par rapport au plasmide non modifié. Ce phénomène peut refléter le blocage de la réplication du plasmide par la lésion et traduit la toxicité de la lésion considérée.

Afin d'étudier la toxicité des adduits N2-G et C8-G du 4NQO, nous utilisons la possibilité d'obtenir des plasmides portant une proportion et un nombre différents d'adduits N2-G. Après transformation bactérienne, la numération des transformants résistants à l'ampicilline (Ap^R) permet de calculer l'efficacité de transformation du plasmide modifié

et du plasmide témoin non modifié (en transformants par ng d'ADN). Le rapport de ces deux valeurs donne l'efficacité relative de transformation (ERT, en %) pour le nombre d'adduits du plasmide considéré.

La figure 10 représente les ERT obtenues dans la souche sauvage AB1157 pour des plasmides portant de 0 à 120 lésions dont 50 ou 80% d'adduits N2-G. On observe que l'ERT chute lorsque le nombre d'adduits augmente ce qui démontre que ces lésions et leur nombre sont bien responsables du phénomène observé. De plus, à nombre égal de lésions, la chute d'ERT est plus forte lorsque l'adduit N2-G est plus représenté (80%).

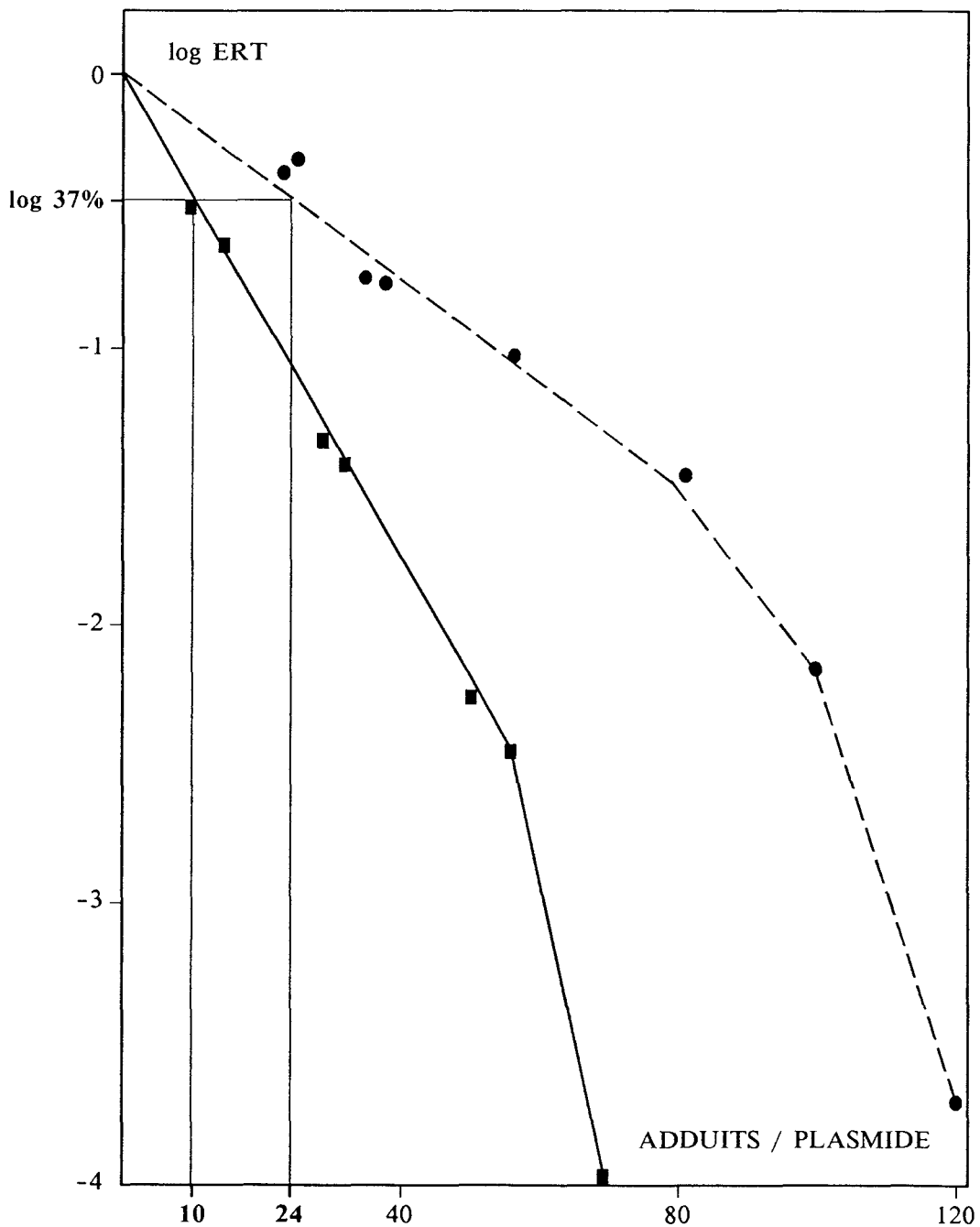


Figure 10: Efficacité relative de transformation (ERT) dans la souche sauvage AB1157 en fonction du nombre de lésions par plasmide; ■ 50% d'adduits N2-G; ● 80% d'adduits N2-G.

A l'aide de ce diagramme, il est possible de calculer le nombre d'adduits provoquant une survie de 37% des plasmides transfectés dans la bactérie; cette valeur, que par commodité nous appellerons le 37%, correspond d'après la loi de Poisson, à 1 événement léthal par plasmide (Koffel-Schwartz *et al.*, 1984) et traduit la toxicité des lésions considérées. Ce 37% est de 24 lésions pour 50% de N2-G alors qu'il n'est que de 10 lésions pour 80% d'adduits N2-G; la toxicité observée, beaucoup plus forte lorsque l'adduit N2-G est en plus grande proportion, est donc directement fonction du pourcentage d'adduits N2-G. Dans cette même expérience, la toxicité chute de moitié alors que les pourcentages de C8-G et de N6-A doublent (Tableau II, p.37); ceci démontre que les adduits mineurs ont peu d'influence dans la toxicité observée. Nous pouvons donc affirmer que les adduits C8-G et N6-A présentent une toxicité négligeable par rapport au N2-G.

Cette faible toxicité du C8-G est d'ailleurs une des raisons pour lesquelles nous n'avons pas utilisé la méthode de modification ciblée sur le fragment 6S (en C8 de la guanine) pour déterminer la toxicité de l'adduit C8-G. En effet, les chutes d'ERT observées auraient été trop faibles pour permettre une détermination précise du 37%.

De ces différents résultats, il apparaît clairement que le dGuo-N2-AQO est le plus toxique des adduits du 4NQO; représenté à 50% *in vivo*, il est probablement le principal responsable de la toxicité du 4NQO observée aussi bien chez le Procaryote que chez l'Eucaryote (Sugimura, 1981).

La toxicité d'une lésion est corrélée à un arrêt de la réplication par blocage de l'ADN polymérase. La déformation de la double hélice provoquée par l'adduit peut expliquer cet arrêt de l'enzyme; cette corrélation a été parfaitement démontrée grâce aux travaux effectués sur les deux adduits C8 du N-AAF. En effet, il a été décrit que le C8-AF induit une déformation faible de l'ADN (*Modèle externe*) et qu'il ne semble pas bloquer la réplication; ceci a pu être démontré de manière directe à l'aide d'une étude montrant que l'activité 3'-5' exonucléasique de l'ADN polymérase du phage T4 (Polymérase T4) n'est pas bloquée au niveau de cette lésion. Dans la cellule, ces propriétés se manifestent par une faible toxicité puisque le 37% du C8-AF est atteint pour 60 adduits (Bichara & Fuchs, 1985). Par contre, son équivalent acétylé, le C8-AAF, provoque une déformation importante de l'ADN associée à une dénaturation de la double hélice (*Modèle insertion-dénaturation*); cette lésion bloque les ADN polymérases procaryotes et eucaryotes (Moore *et al.*, 1981) et sa toxicité est élevée puisque le 37% correspond à 15 adduits par plasmide (Koffel-Schwartz *et al.*, 1984).

Dans le cas du 4NQO, les récents travaux de l'équipe de I.Walker sont venus démontrer, en utilisant notre modèle de cancérogène ultime, que l'adduit N2-G est capable d'inhiber l'activité exonucléasique de la Polymérase T4 alors que l'adduit C8-G ne l'est pas (Panigrahi & Walker, 1989). Ce résultat a d'ailleurs été confirmé au laboratoire par Galiègue-

Zouitina qui observe qu'un ADN simple brin portant 16 adduits N2-G n'est pas ou peu digéré par la Polymérase T4 alors qu'un ADN non modifié ou modifié par 32 adduits C8-G est très rapidement dégradé (résultats non publiés). De plus, de précédents travaux ont démontré qu'un ADN portant 50% d'adduits N2-G est très sensible à l'attaque par l'Endonucléase S1, DNase spécifique des régions simples brins de l'ADN; cette dégradation enzymatique a probablement lieu autour de la lésion et sur le brin complémentaire (Galiègue *et al.*, 1982).

Ces différents résultats, corrélés avec la forte toxicité du N2-G (comparable à celle du C8-AAF), viennent renforcer l'hypothèse proposée par Galiègue-Zouitina et Bailleul sur la conformation de l'ADN induite par le 4NQO (Galiègue-Zouitina, 1984; Bailleul, 1984) et selon laquelle l'adduit N2-G, impliqué dans l'appariement des paires de bases, serait situé dans le petit sillon et capable de provoquer une déformation importante de la double hélice; l'adduit C8-G, probablement localisé dans le grand sillon et démontré peu toxique, répondrait à un modèle de type C8-AF et ne déformerait pas la double hélice.

B. REPARATION

Il a été démontré qu'une souche sauvage d'*E.coli* dont l'ADN génomique est modifié *in vivo* par le 4NQO est capable d'exciser 85% des lésions en 60 minutes (Ikenaga *et al.*, 1975). De plus, cette réparation nécessite le produit des gènes *uvrA*, *uvrC*, *recA* et *polA* (Kondo *et al.*, 1970), soit un système UvrABC complet et efficace.

Afin de démontrer que l'adduit N2-G est bien excisé par le système UvrABC, nous avons étudié les chutes d'ERT de plasmides modifiés à 55% en N2 dans la souche sauvage AB1157 et dans les souches *uvrA* et *uvrC* (c'est-à-dire mutées sur le gène *uvrA* ou *uvrC*). Les résultats nous permettent d'estimer la toxicité des lésions dans ces différentes souches (Fig.11). Alors que l'on obtient un 37% de 20 adduits dans AB1157, il n'est que de 5 environ dans les souches déficientes pour l'excision.

Ceci confirme l'implication du système UvrABC dans la réparation des adduits du 4NQO. De plus, l'adduit N2-G est la seule des lésions du 4NQO suffisamment toxique pour expliquer un 37% de 5 adduits dans *uvrA* et *uvrC*; nous pouvons donc penser que ce résultat démontre la réparation de l'adduit N2-G par UvrABC.

La faible toxicité de l'adduit C8-G étant masquée par celle du N2-G beaucoup plus forte, la même expérience réalisée avec 80% d'adduits N2-G ne nous aurait pas permis de conclure quant à la réparation du C8-G. L'excision de 85% des lésions observée par Ikenaga semble cependant impliquer que le N2-G n'est pas le seul adduit du 4NQO à être réparé par excision.

Il est intéressant de citer à ce niveau les travaux de l'équipe de Waters chez l'Eucaryote (Mirzayans *et al.*, 1981 et 1985; Edwards *et al.*, 1987); en effet, ces auteurs ont

mis en évidence un autre type de lésions induites par le 4NQO, les cassures simples brins de classe I (*4NQO-class I SSB*), obtenues après un bref traitement alcalin de l'ADN modifié. Il a été proposé que ces cassures résulteraient des sites apuriniques créés par l'adduit C8-G instable en milieu basique (Bailleul *et al.*, 1989). Waters et son équipe ont démontré que ce type de lésion est rapidement réparé aussi bien dans les cellules normales que dans les fibroblastes de *Xeroderma pigmentosum* déficients pour l'excision. Il semble donc que l'adduit C8-G ou la lésion résultant de sa dégradation puisse être également réparé par une autre voie que le système d'excision-réparation. Cette propriété du C8-G pourrait d'ailleurs rendre compte du caractère radio-mimétique du 4NQO observé dans les cellules radio-sensibles de type *Ataxia telangiectasia* (Regan & Setlow, 1974; Paterson *et al.*, 1979).

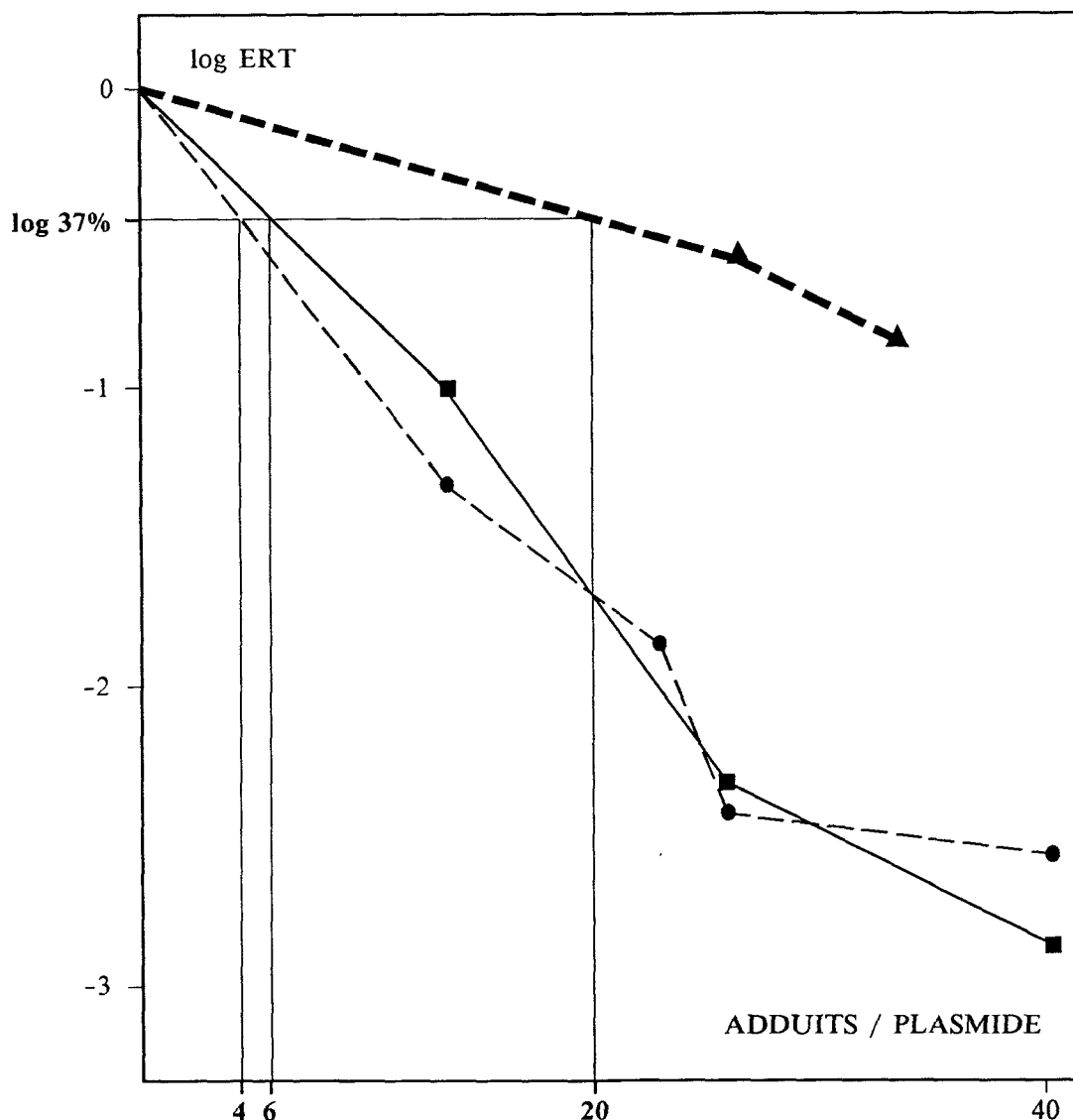


Figure 11: Efficacité relative de transformation (ERT) en fonction du nombre de lésions par plasmide; 55% d'adduits N2-G; ▲ souche sauvage AB1157, ■ souche *uvrA* AB1886, ● souche *uvrC* AB1884.

Le 4NQO est également qualifié d'UV-mimétique en raison de la toxicité qu'il manifeste dans les cellules sensibles aux UV (bactéries *uvr-*, cellules de *Xeroderma pigmentosum*, par exemple) (Takebe *et al.*, 1972; Ikenaga *et al.*, 1975). Ces observations ont maintenant une explication moléculaire, tout au moins chez le Procaryote. En effet, l'adduit N2-G, le plus représenté *in vivo* et le plus toxique des adduits du 4NQO, est effectivement réparé par le système UvrABC, principal responsable de la réparation des lésions induites par les UV.

III. MUTAGENESE INDUITE PAR LES ADDUITS DU 4NQO

Lorsque le 4NQO est utilisé pour modifier le chromosome bactérien, les fonctions SOS de l'hôte sont induites (Quillardet *et al.*, 1982); d'autre part, dans une souche *recA* ou *lexA* où le système SOS ne peut plus être induit, les propriétés mutagènes du 4NQO ne se manifestent plus (Kondo *et al.*, 1970; Ishii & Kondo, 1975; Ivanovic & Weinstein, 1980). Ces résultats démontrent bien que la mutagénèse induite par les adduits du 4NQO nécessite la présence des fonctions SOS de la bactérie.

Dans le système que nous utilisons, la mutagénèse induite par les adduits est estimée par mesure de la fréquence de mutation (Fm) du gène de résistance à la tétracycline (Tc). La Fm est donnée par le rapport entre le nombre de mutants Tc sensibles isolés ($Ap^R Tc^S$) et le nombre de transformants testés (Ap^R).

Lorsque l'on transforme directement une bactérie par un plasmide modifié par l'Ac-4HAQO, la mutagénèse observée est très faible. Ce phénomène a déjà été observé dans ce système avec les adduits C8 du N-AAF et interprété comme traduisant l'incapacité du plasmide lésé à induire les fonctions SOS de la bactérie (Koffel-Schwartz *et al.*, 1984; Bichara & Fuchs, 1985).

Nous allons tout d'abord nous intéresser à démontrer que les adduits N2-G et C8-G sont effectivement mutagènes et ceci quand les fonctions SOS ont été préalablement induites chez la bactérie. Pour en apporter la preuve directe, nous utiliserons une souche mutée sur *umuC* (GW2100), un des gènes responsables de la mutagénèse induite par le système SOS (Walker G., 1984; Bagg *et al.*, 1981).

Afin d'évaluer la mutagénicité respective des 2 principaux adduits du 4NQO, nous allons également mesurer la Fm de différents plasmides en fonction du nombre d'adduits N2-G ou C8-G.

D'autre part, le système pBR322 permet de repérer des mutants *forts*, Tc sensibles quelque soit la dose d'antibiotique ($Tc_{20}^S Tc_{40}^S$) mais aussi des mutants résistants à une dose

moyenne de tétracycline ($20\mu\text{g/ml}$, voir Matériel et Méthodes); ces mutants *faibles* ($\text{Tc}_{20}^{\text{R}}\text{Tc}_{40}^{\text{S}}$) contiennent un plasmide dont la mutation n'affecte que partiellement la protéine codée. L'apparition ou non de ces mutants faibles nous fournira déjà quelques informations sur la mutagenèse du 4NQO avant d'aborder, dans le chapitre suivant, la nature des mutations induites par les différents adduits.

A. MUTAGENESE ET SYSTEME SOS

La mutagenèse des lésions N2-G et C8-G a été déterminée lorsque les fonctions SOS ne sont pas induites et ceci à l'aide d'un plasmide portant 45 lésions dont 75% d'adduits N2-G. La Fm observée est faible (0,3%); il semble donc que le blocage de la réplication d'un plasmide ne soit pas un événement suffisant chez *E.coli* pour provoquer la réponse SOS et induire une mutagenèse significative.

La mutagenèse du N2-G a été étudiée dans une bactérie dont le système SOS est induit par irradiation UV du chromosome bactérien avant transformation bactérienne. La figure 12 représente la Fm d'un plasmide modifié par 45 adduits dont 75% de N2-G et ceci pour des doses croissantes d'irradiation UV des bactéries (en J/m^2). On observe que le

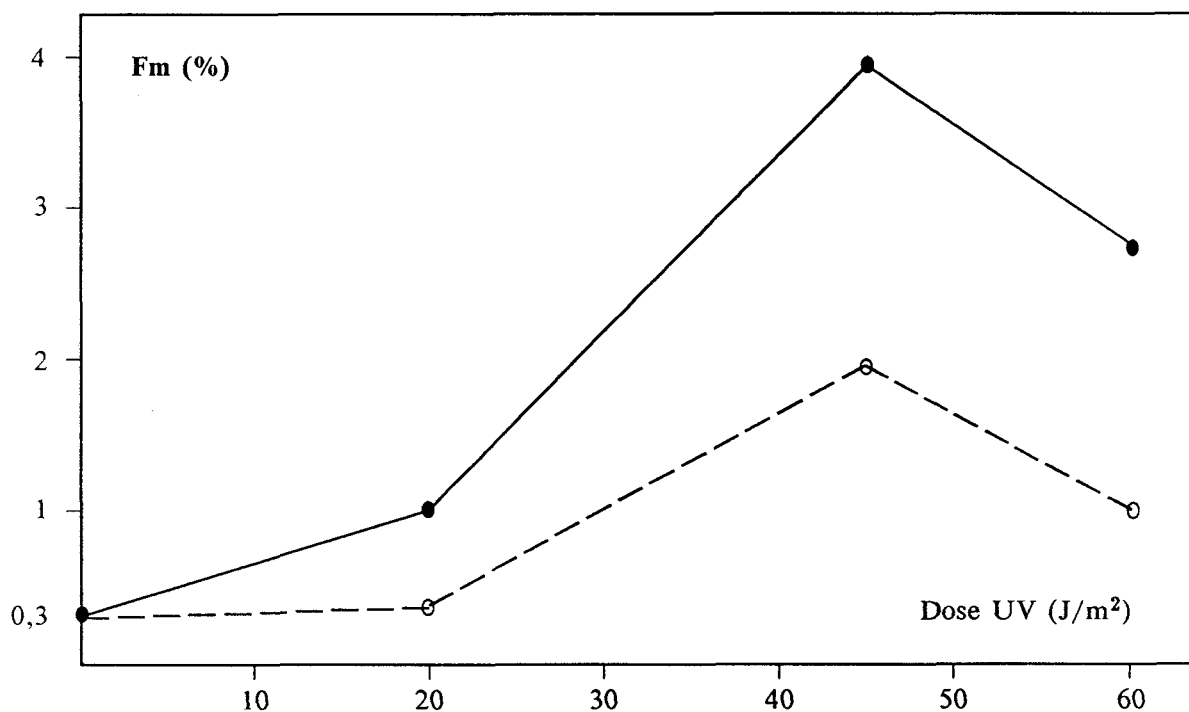


Figure 12: Fréquence de mutation (Fm) en fonction de la dose UV appliquée aux bactéries avant transformation; plasmide utilisé: 45 lésions dont 75% d'adduits N2-G; souche sauvage AB1157; ● mutants $\text{Tc}_{40}^{\text{S}}$; ○ mutants $\text{Tc}_{20}^{\text{R}}\text{Tc}_{40}^{\text{S}}$.

maximum de mutagénèse est atteint pour 45 J/m². Dans la littérature, la dose décrite comme induisant pleinement le réponse SOS est de 30 J/m², irradiation qui correspond à une survie de 30% des bactéries. La valeur indiquée par notre dosimètre semblant élevée, nous avons contrôlé la survie des bactéries irradiées et obtenons également une valeur d'environ 30%.

Dans cette expérience, la Fm maximale est de 3,4% alors qu'elle n'est que de 0,3% sans irradiation UV. L'induction des fonctions SOS permet donc d'induire une mutagénèse environ 10 fois plus importante. Une autre confirmation est apportée par l'étude de la mutagénicité de différents plasmides modifiés mais dans la souche GW2100, mutée sur le gène *umuC* décrit comme un des principaux responsables de la mutagénèse SOS-induite (Bagg *et al.*, 1981). Toutes les autres fonctions SOS ont été induites par irradiation des bactéries (45J/m²); la Fm observée tombe alors à 0,4 et 0,3% et ceci pour des plasmides portant respectivement 15 et 30 adduits dont 75% de N2-G et 15% de C8-G (Fig.13, p.47). Ces valeurs sont comparables à celle obtenue dans la souche sauvage sans induction des fonctions SOS; il paraît donc évident que la mutagénèse induite par le 4NQO requiert le produit du gène *umuC*. De plus, on peut noter que lorsque l'on double le nombre de lésions (N2-G et C8-G), la mutagénèse n'est pas augmentée; cette observation tend à démontrer que la protéine UmuC intervient au niveau de la conversion de la lésion en mutation et ceci au moins pour les deux principaux adduits du 4NQO. Comme l'avaient souligné Wood et Sedgwick pour le C8-AF (Wood & Sedgwick, 1986), il est étonnant de constater qu'un adduit ne bloquant pas la réplication (C8-G) présente une mutagénèse UmuC-dépendante.

De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que la conversion des adduits du 4NQO en mutations nécessite l'intervention des fonctions SOS de l'hôte, la protéine UmuC étant directement impliquée dans ce phénomène; le mécanisme de mutagénèse n'est donc pas de type *direct-miscoding* comme dans le cas des alkylants (voir Généralités) mais semble correspondre au modèle plus complexe proposé par Wood et Sedgwick où RecA* incorpore une base erronée face à l'adduit, UmuC et UmuD clivée permettant la reprise de la réplication au-delà de la lésion par l'ADN polymérase (Wood & Sedgwick, 1986).

B. MUTAGENICITE DES LESIONS

Les expériences décrites dans la littérature n'ont jamais permis de déterminer si tous les adduits du 4NQO pouvaient induire des mutations et si tous les adduits mutagènes avaient la même importance dans la mutagénèse observée. L'adduit N2-G est certes le plus représenté *in vivo* mais il n'est pas rare que la lésion majeure ne soit pas la plus mutagène. C'est le cas par exemple du C8-AAF, le plus mutagène des 2 adduits C8 du N-AAF et présent *in vivo* à 23% contre 70% pour le C8-AF; pour le cisplatine, drogue anti-tumorale capable

d'induire des adduits intrachâînes entre deux purines adjacentes, il a été démontré que les adduits formés dans les séquences ApG (25% de la modification totale *in vivo*) étaient 5 fois plus mutagènes que les adduits formés sur les GpG (65% de la modification totale *in vivo*) (Burnouf *et al.*, 1987). Dans le cas du diméthyl-benzanthracène, la situation est encore plus extrême puisque l'essentiel de la mutagénèse observée *in vivo* semble être dû à un adduit mineur présent sur l'adénine (Quintanilla *et al.*, 1988; Bailleul *et al.*, 1988). Nous avons donc cherché à mesurer le potentiel mutagène des adduits du 4NQO, en particulier des lésions N2-G et C8-G.

Pour cela, nous avons utilisé deux approches différentes pour étudier chaque adduit (voir Matériel et Méthodes) :

- la modification du plasmide entier (superenroulé) pour obtenir principalement le N2-G
- la modification du fragment 6S dénaturé qui porte alors essentiellement des adduits C8-G

Pour l'adduit N2-G, nous avons déterminé la Fm de différents plasmides modifiés (N2-G=75%). Ces plasmides sont utilisés pour transformer la souche sauvage préalablement irradiée (45J/m²); le rapport entre le nombre de mutants Tc^S isolés et le nombre de transformants testés nous donne la Fm pour le nombre de lésions présentes sur le plasmide (Fig.13). Lorsque le pBR322 n'est pas modifié, la Fm n'est que de 0,03% (1 clone Tc^S/3500 Ap^R). Cette valeur correspond tout à fait à la fréquence de mutagénèse spontanée et constitue le bruit de fond du système. On observe que la Fm augmente de façon linéaire en fonction du nombre de lésions; la mutagénèse obtenue dans nos expériences est donc bien induite par les adduits. Pour 40 lésions, la Fm obtenue est de 3%; dans le même système et pour le même nombre d'adduits, elle n'est que de 0,6% pour le C8-AF et de 1% pour le C8-AAF. Les 75% de N2-G et 15% de C8-G semblent donc responsables d'une mutagénèse 3 fois plus importante que celle du C8-AAF; ceci confirme le caractère particulièrement mutagène du 4NQO.

Ces données vont nous permettre d'estimer la mutagénicité du N2-G, mais auparavant nous avons mesuré la Fm d'un plasmide modifié uniquement sur le fragment BamHI-SalI (fragment 6S) du gène Tc, à 90% en C8 de la guanine. Lorsque ce fragment porte 6,8 adduits, la Fm obtenue est de 1,09% (25 clones Tc^S/2285 clones Ap^R testés); dans le même système, pour 6 adduits C8-AAF par 6S, on observe une Fm de 1,1%. Il semble donc que l'adduit C8-G ait le même pouvoir mutagène que le C8-AAF; le facteur 3 observé dans l'expérience précédente où le N2-G est le plus représenté pourrait donc rendre compte de la très forte mutagénicité de cet adduit N2-G.

Pour concrétiser cette observation, il est possible d'évaluer la mutagénicité

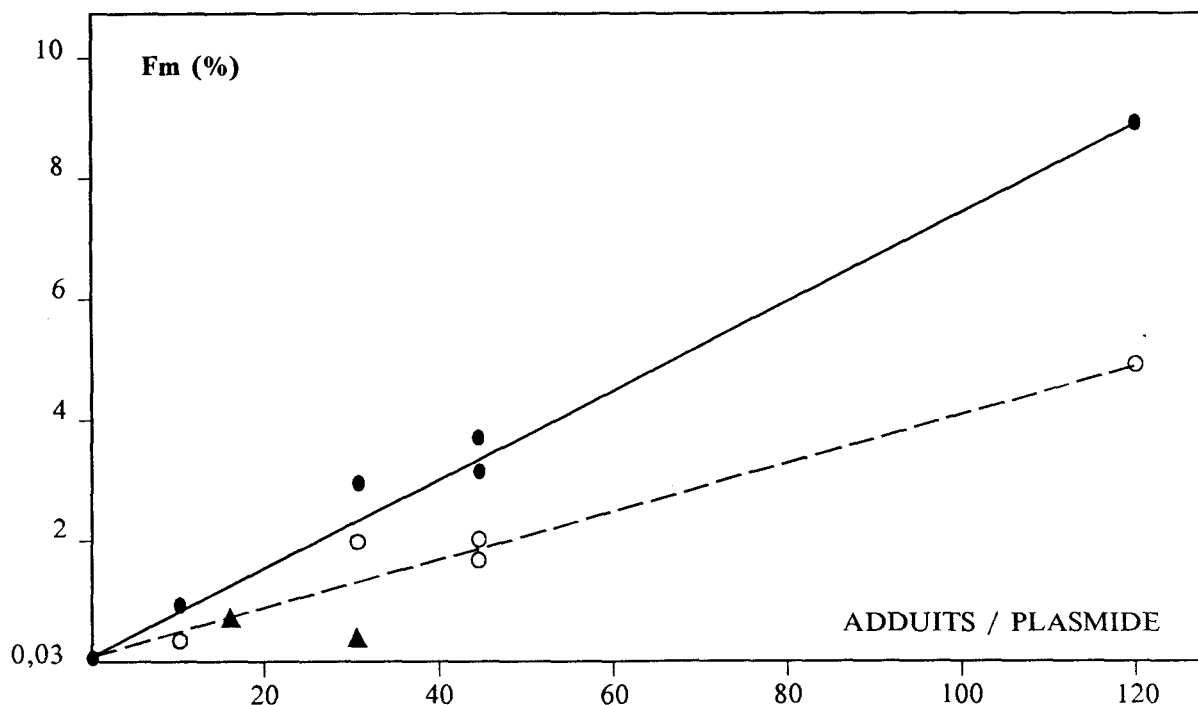


Figure 13: Fréquence de mutation (Fm) en fonction du nombre d'adduits par plasmide. pBR322. Préirradiation UV des bactéries: $45\text{J}/\text{m}^2$; 75% d'adduits N2-G; souche sauvage AB1157: ● mutants $\text{Tc}_{40}^{\text{S}}$, ○ mutants $\text{Tc}_{20}^{\text{R}} \text{Tc}_{40}^{\text{S}}$; souche *umuC* (GW2100): ▲ mutants $\text{Tc}_{40}^{\text{S}}$.

respective du N2-G et du C8-G. La mutagénèse du N2-G a été étudiée sur le plasmide entier (cible de mutagénèse : gène Tc, 1200 pb) alors que celle du C8-G est observée sur le fragment 6S (276 pb); il nous faut donc calculer une valeur standart qui permette une comparaison quantitative de la mutagénèse obtenue par les deux différentes méthodes. Cette valeur est le MCS (*Mutation Cross-Section* ou «section efficace de mutagénèse») qui se définit comme la fréquence de conversion (10^{-3}) d'une lésion prémutagène en mutation non silencieuse (Koffel-Schwartz *et al.*, 1984). Dans notre cas, nous calculerons le $(\text{MCS})_{\text{av}}$ (av pour *average*) qui correspond au MCS moyen sur la cible de mutagénèse choisie pour mesurer la Fm (ici : le gène Tc ou le fragment 6S). Ce $(\text{MCS})_{\text{av}}$ évalue la mutagénicité globale de la lésion présente sur la cible; en d'autres termes, il ne tient pas compte des variations éventuelles de mutagénicité d'un site à l'autre de la cible, variations dues à l'influence possible de la séquence nucléotidique sur la conversion de la lésion en mutation (*Hot spot* ou séquence «chaude» de mutagénèse). De plus, cette valeur n'est réellement significative que si la cible ne présente pas de séquences plus réactives que d'autres envers le cancérigène; avec le 4NQO, il faut donc que chaque guanine ait la même probabilité de porter une lésion prémutagène.

Pour le 4NQO, cette condition est remplie; en effet, les travaux de l'équipe de I.Walker qui utilise notre modèle de cancérigène ultime *in vitro*, démontrent qu'il n'existe

pas de fixation préférentielle de la quinoléine sur certaines séquences de l'ADN, aussi bien pour l'adduit N2-G que pour le C8-G (Panigrahi & Walker, 1989).

Avant de calculer les MCS respectifs des adduits N2-G et C8-G, nous définirons certaines abréviations utilisées :

-(MCS)_{av}N2-G₇₅ : MCS moyen obtenu avec 75% d'adduits N2-G sur le plasmide

-(MCS)_{av}N2-G : MCS moyen extrapolé à 100% d'adduits N2-G sur le plasmide

-(MCS)_{av}C8-G : MCS moyen obtenu avec 90% d'adduits C8-G sur le fragment 6S (les 2% d'adduits N2-G sont négligeables)

La contribution de l'adduit N6-A a été volontairement négligée dans ces calculs. En effet, la littérature sur la mutagénèse du 4NQO indique qu'aucune mutation n'apparaît sur l'adénine et ce résultat a été confirmé dans le système que nous utilisons (voir chap.IV).

Pour calculer le (MCS)_{av} de l'adduit N2-G, nous considérerons un plasmide modifié à 75% en N2 et portant 100 lésions, soit 28 adduits sur le gène Tc. D'après la figure 13, la Fm observée sur ce gène est de 8% soit $80 \cdot 10^{-3}$ mutations pour 28 adduits. Pour 1 adduit, on obtient $0,08/28 = 2,9 \cdot 10^{-3}$ mutations d'où $(MCS)_{av}N2-G_{75} = 2,9$. Autrement dit, sur 1000 lésions prémutagènes, 2,9 sont converties en mutation non silencieuse; les 997,1 restantes sont réparées par excision, n'induisent aucune mutation ou sont converties en mutation silencieuse.

Pour le C8-G, la cible de mutagénèse est le fragment 6S. Pour 6,8 adduits par 6S, la Fm obtenue sur cette cible est de 1,09% soit $10,9 \cdot 10^{-3}$ mutations. Pour 1 lésion par cible, on obtient $10,9 \cdot 10^{-3}/6,8 = 1,6 \cdot 10^{-3}$ mutations d'où $(MCS)_{av}C8-G = 1,6$.

Pour le C8-AAF, le (MCS)_{av} calculé avec le 6S comme cible de mutagénèse est de 1,8. Lorsque la totalité du plasmide est modifiée par le C8-AAF, la cible est alors le gène Tc entier et le (MCS)_{av} passe de 1,8 à 1,2 (Koffel-Schwartz *et al.*, 1984); ce biaisage lié à la cible choisie traduit probablement une plus grande sensibilité aux mutations du début du gène Tc. On peut considérer que le même biaisage s'applique à la valeur obtenue pour le C8-G et l'on obtient alors $(MCS)_{av}C8-G = 1,1$ avec le gène Tc comme cible de mutagénèse.

Le (MCS)_{av}N2-G₇₅ a été obtenu avec un plasmide modifié à 75% en N2 et 15% en C8; si l'on tient de cette proportion et du (MCS)_{av}C8-G, il est possible de calculer un (MCS)_{av}N2-G pour 100% d'adduits N2-G :

$$0,75 \cdot (MCS)_{av}N2-G + 0,15 \cdot (MCS)_{av}C8-G = 100\% \cdot (MCS)_{av}N2-G$$

On obtient alors $(MCS)_{av}N2-G = 3,6$. Nous pouvons donc affirmer que l'adduit N2-G est au moins 3 fois plus mutagène que l'adduit C8-G. En tenant compte de la répartition 50/30 *in vivo* et de la mutagenicité respective de ces deux adduits, nous avons calculé que l'adduit N2-G était responsable de plus de 80% de la mutagenèse induite par le 4NQO. Les caractéristiques de ce cancérigène (UV-mimétisme, toxicité et mutagenicité élevés) sont donc essentiellement dues aux propriétés intrinsèques de son adduit majeur, le dGuo-N2-AQO.

Au cours de nos expériences de mutagenèse, nous avons obtenu une certaine proportion de mutants faibles ($Tc_{20}^R Tc_{40}^S$), aussi bien avec l'adduit N2-G qu'avec le C8-G. Cette proportion est de 50% pour le N2-G (Fig.12 et 13) et de 12% pour le C8-G (3/25). Ce phénotype correspond à la mutation d'un codon et donc un changement d'acide aminé n'inactivant que partiellement la protéine codée par le gène Tc; cette mutation sera obligatoirement une substitution puisque les délétions confèrent systématiquement le phénotype Tc_{20}^S par décalage du cadre de lecture (-1 ou -2 bases) ou perte d'acide aminé (-3 bases en phase). Nous pouvons donc attendre une certaine proportion de substitutions pour les deux adduits mutagènes N2-G et C8-G. Cependant, les valeurs de 50 et 12% ne sont pas interprétables; en effet, ces proportions dépendent assez peu du type de substitution mais surtout du changement d'acide aminé induit par la mutation et de sa localisation dans la protéine.

IV. NATURE DES MUTATIONS INDUITES PAR LES ADDUITS DU 4NQO

Avant d'aborder ce chapitre, il nous semble important de bien différencier les adduits C8-G et N2-G; en effet, bien que la molécule de cancérigène soit la même et se fixe sur la guanine dans les deux cas, nous pouvons rappeler que les sites réactifs sont différents à la fois sur le noyau quinoléine (C8-G : nitrénium en position 4; N2-G : carbénium en C2) et sur la base (N2 ou C8); de plus, seul l'adduit N2-G intervient directement dans l'appariement des paires de bases G:C. Certaines études physico-chimiques semblent indiquer que les déformations de l'ADN induites par les 2 lésions sont différentes, ce qui d'après nos résultats, peut être corrélé aux propriétés biologiques de chacun de ces adduits. Nous allons maintenant voir si ces différences ont également des conséquences sur la nature des mutations induites par ces deux principaux adduits.

Les plasmides utilisés pour l'étude du C8-G ont été obtenus par modification ciblée sur le fragment 6S du gène Tc (voir Matériel et Méthodes); pour le N2-G, nous avons

également utilisé cette technique mais la majorité des mutants a été isolée à partir de plasmides entièrement modifiés; dans ce cas, une cartographie par délétion a été nécessaire afin de sélectionner les clones dont le plasmide est muté sur le fragment 6S. En effet, nous avons limité notre étude des mutations induites à ce fragment de restriction de 276 paires de bases, compatible avec les méthodes de séquençage en une étape (technique de Maxam & Gilbert, 1977).

Les mutants Tc^S sélectionnés à partir de plasmides modifiés à 90% en C8 de la guanine vont nous permettre de déterminer la nature des mutations induites spécifiquement par l'adduit C8-G; comme nous pourrions le constater, les 4% de N6-A ne vont induire aucune mutation.

Pour les plasmides modifiés à 75% en N2 de la guanine, il est important de démontrer que les mutations analysées sont bien induites par les adduits N2-G et non pas par les autres adduits présents sur le plasmide, c'est à dire le C8-G (15%) et le N6-A (5%). Pour l'adduit N6-A, nous verrons qu'aucune mutation n'implique une adénine. En ce qui concerne le C8-G, nos précédentes études ont démontré que cet adduit est environ trois fois moins mutagène que le N2-G; l'utilisation du $(MCS)_{av}$ respectif de chaque adduit nous a permis de calculer que la mutagenèse induite par le C8-G sur ces plasmides est négligeable puisqu'elle ne représente pas plus de 3% de la mutagenèse totale observée. De plus, comme nous le verrons plus loin (chap.V), l'analyse des mutations observées avec 75% de N2-G ou 90% de C8-G révèle des caractéristiques différentes pour ces deux adduits.

La séquence nucléotidique complète du fragment 6S est reportée sur la figure 14 (p.62)

A. MUTATIONS INDUITES PAR L'ADDUIT N2-G

L'analyse porte sur 17 mutants isolés à partir de la souche sauvage AB1157 (Tableau III). Sur ces 17 mutants, 6 ont été obtenus par mutagenèse ciblée sur le fragment 6S; le nombre de lésions par plasmide ou par 6S est reporté dans le Tableau III. Toutes les expériences de mutagenèse ayant permis d'isoler ces mutants ont été réalisées après induction des fonctions SOS de la bactérie ($45J/m^2$); nous avons cependant séquencé un mutant non SOS-induit : NW17. D'autre part, il faut préciser que seuls les mutants forts de phénotype Tc_{20}^S ont été séquencés; le biaisage introduit sera corrigé plus loin.

Le séquençage des 17 mutants a permis d'identifier et de localiser 19 mutations; en effet, les mutants NW2 et NW3 portent 2 mutations sur leur fragment 6S. On constate

Tableau III. Mutagenèse induite par l'adduit N2-G: description des mutants; (c): changement d'acide aminé conservatif.

Mutant	Adduits /pBR322	Induction SOS	Site de mutation	Mutation	Changement d'acide aminé
NW1	120	+	411-412	-G	
NW2	120	+	415	-G	
NW3	1,2/6S	+	416 536-540	-G -G	
NW4	1,2/6S	+	578-586	-GCG	
NW5	45	+	393	G:C->A:T	Arg -> His (c)
NW6	45	+	449	G:C->A:T	Asp -> Asn (c)
NW7	1,2/6S	+	524	G:C->A:T	Gly -> Ser (c)
NW8	45	+	528	G:C->A:T	Pro -> Leu
NW9	120	+	528	G:C->A:T	Pro -> Leu
NW10	1,2/6S	+	549	G:C->A:T	Gly -> Asp (c)
NW2	120	+	447	G:C->T:A	Ala -> Val
NW11	1,2/6S	+	513	G:C->T:A	Gly -> Val
NW12	1,2/6S	+	513	G:C->T:A	Gly -> Val
NW13	45	+	524	G:C->C:G	Gly -> Arg
NW14	30	+	525	G:C->T:A	Gly -> Val
NW15	45	+	525	G:C->T:A	Gly -> Val
NW16	30	+	631	G:C->T:A	Gln -> His (c)
NW17	1,2/6S	-	451	G:C->T:A	Asp -> Glu (c)

que toutes les mutations impliquent des paires de bases G:C. L'adduit N6-A n'intervient donc pas; d'après nos calculs, les 75% de lésions N2-G sont responsables de plus de 95% de la mutagenèse observée avec ces plasmides; nous pouvons donc affirmer que les mutations identifiées sont toutes parfaitement ciblées sur les adduits N2-G.

La mutagenèse caractéristique du N2-G nécessitant la présence des fonctions SOS, notre analyse des mutations portera sur les mutants NW1 à NW16. On observe que 72% des mutations sont des substitutions (13/18). Cette valeur est cependant sous-estimée. En effet, nous n'avons séquencé que des mutants Tc₂₀^S alors que 50% des mutants N2-G sont faibles (Tc₂₀^RTc₄₀^S) (voir chap.III); les mutations portées par ces mutants faibles ne peuvent être

que des substitutions puisque toute délétion entraîne le phénotype Tc₂₀^S par décalage du cadre de lecture ou perte d'un codon. Ceci nous permet de corriger le biaisage introduit et d'affirmer que 86% des mutations non silencieuses induites sont des substitutions; de plus, cette valeur ne tient pas compte de la proportion non négligeable de mutations silencieuses induites par le N2-G (dégénérescence du code génétique). De ces résultats, il apparaît donc clairement que l'adduit N2-G du 4NQO induit probablement plus de 90% de substitutions et peut être considéré comme spécifique de ce type de mutations.

A ce niveau, on peut remarquer qu'aucune substitution n'aboutit à la formation d'un codon non sens (ochre, ambre ou opale) alors que sur le fragment 6S, 11 sites sont susceptibles de donner ce type de codon par substitution d'une guanine (Bichara & Fuchs, 1985). De plus, parmi les 14 substitutions observées, 6 conduisent à un changement conservatif d'acide aminé (selon French & Robson, 1983). Ces différentes observations démontrent la très grande sensibilité de la protéine codée par le gène Tc à toute modification de sa séquence peptidique; le système pBR322 est donc particulièrement bien adapté à notre étude puisqu'il permet de déceler une très grande partie des mutations susceptibles d'apparaître au cours de la mutagénèse.

Si l'on considère les différents types de mutation, on observe :

- Les délétions : elles représentent environ 10% de la mutagénèse induite par l'adduit N2-G. Sur les 5 délétions identifiées, 2 sont situées dans des séquences dites répétitives où l'on observe au moins 3 répétitions d'une base ou d'un groupe de base. Ces deux mutations résultent de la délétion d'une unité de répétition à savoir : -G dans la séquence ⁵³⁶GGGGG⁵⁴⁰(NW3) et -GCG dans la séquence ⁵⁷⁸GCGGCGGCG⁵⁸⁶(NW4) (numérotation d'après Sutcliffe, 1979). Ce type de mutagénèse a été décrit par Streisinger et apparaît selon un mécanisme bien étudié; ce phénomène peut se décomposer en trois étapes (d'après Streisinger *et al.*, 1966) :

- la réparation de la lésion par le système UvrABC avec apparition d'une région simple brin de 12 à 15 nucléotides où s'amorce la resynthèse de l'ADN

- le «glissement» du brin parental sur le brin néosynthétisé avec désappariement d'une ou de plusieurs unités de répétition

- la restauration de l'ADN double brin puis la délétion de l'unité de répétition non appariée par le ou les systèmes de réparation adéquats

Cet événement est souvent impliqué dans la mutagénèse spontanée (Ripley *et al.*, 1986; Schaaper *et al.*, 1986) mais sa fréquence est plus élevée en présence de cancérrogènes. Cette mutagénèse n'est donc pas spécifique d'un type de lésion puisque tout adduit volumineux semble susceptible de l'induire (Koffel-Schwartz *et al.*, 1984; Bichara & Fuchs, 1985; Hebert *et al.*, 1988).

Les 3 autres délétions (NW1, 2 et 3) sont situées dans une séquence riche en bases G et C (⁴¹³GGCGCC⁴¹⁸). Ce site correspond à un des «points chauds» de mutagenèse de l'adduit C8-AAF; il a été baptisé *NarI* car sa séquence correspond au site de restriction reconnu par cette enzyme (Koffel-Schwartz *et al.*, 1984). Dans le cas du C8-AAF, la mutation observée est toujours une délétion d'un doublet CG, probablement en 415-416 (Burnouf *et al.*, 1989); de récents résultats permettent de penser que la fixation du C8-AAF sur *NarI* peut induire une transition B->Z des 2 nucléotides centraux de ce site; cette conformation particulière serait à l'origine d'un mécanisme spécifique de mutagenèse, *recA*⁺ dépendant mais *umuDC* indépendant, responsable de la délétion de cette forme Z locale (Koffel-Schwartz & Fuchs, 1989; Burnouf *et al.*, 1989). Avec l'adduit N2-G du 4NQO, nous n'observons la délétion que d'une seule base et sur différentes guanines du site *NarI*; il semble donc que les mécanismes de mutagenèse impliqués dans ce site soient différents pour les deux adduits N2-G et C8-AAF. Récemment, ce résultat a été confirmé par un essai de réversion effectué dans le système pBR322 modifié *in vivo* par le 4NQO; la séquence mutée à réverter comportait un doublet GC supplémentaire dans le site *NarI* du fragment 6S. Alors que la réversion est importante avec le N-Aco-AAF, aucun révertant -GC n'a été obtenu avec le 4NQO (Bintz et Fuchs, en préparation). D'autre part, il a été démontré que l'adduit N2-G est capable d'inhiber la transition B->Z dans les séquences GC alternées (Bailleul *et al.*, 1984). Il semble donc que le N2-G n'induit pas le même changement de conformation du site *NarI* que le C8-AAF ce qui explique que les mutations observées dans ce site soient différentes pour les deux adduits.

- Les substitutions : elles représentent la plus grande partie de la mutagenèse observée et nous remarquons que plusieurs types de mutations sont induits sur le plasmide. En effet, sur les 13 substitutions identifiées, 6 sont des transitions G en A (46%) et 7 sont des transversions dont 6 G en T (46%) et 1 G en C (8%). L'adduit N2-G est donc capable d'induire aussi bien des G en A que des G en T; autrement dit, face au noyau quinoléine fixé sur l'azote 2 de la guanine, la polymérase semble pouvoir incorporer une thymine (G en A) ou une adénine (G en T) dans les mêmes proportions. A ce niveau, on peut se demander si ces deux bases sont incorporées indifféremment ou si certains paramètres peuvent intervenir dans l'appariement de l'une ou l'autre base avec l'adduit. D'autre part, le 4NQO a toujours été considéré comme induisant principalement des transitions G en A; l'adduit N2-G, responsable de plus de 80% de la mutagenèse induite *in vivo* par le 4NQO, semble induire une forte proportion de G en T; il serait donc intéressant de savoir pourquoi ces transversions n'ont pas été mises en évidence dans les autres systèmes de mutagenèse. Pour tenter de répondre à ces différentes questions, les résultats de la mutagenèse C8-G nous sont nécessaires et nous reviendrons plus loin sur ces points particuliers (chap.V).

B. MUTATIONS INDUITES PAR L'ADDUIT C8-G

L'analyse porte sur 10 mutants, tous obtenus à partir de plasmides modifiés uniquement sur le fragment 6S (Tableau IV). Douze mutations ont été identifiées et comme précédemment, seules les guanines sont affectées; l'adduit N2-G ne représente que 2 à 3% de la modification totale du plasmide pour 90% de C8-G; nous pouvons donc affirmer que les mutations sont bien ciblées face aux adduits C8-G. De plus, comme nous le verrons plus loin (chap.V), les mutations induites par le N2-G et ici par le C8-G présentent certaines caractéristiques différentes; cet argument nous permettra de confirmer que la mutagenèse observée ici est bien induite par l'adduit C8-G du 4NQO.

Tableau IV. Mutagenèse induite par l'adduit C8-G : description des mutants; changement d'acide aminé : (c) conservatif, (nc) non conservatif.

Mutant	Induction SOS	Phénotype	Site de mutation	Mutation	Changement d'acide aminé
CW1	+	Tc ₂₀ ^s	380	-GA	
CW2	+	Tc ₂₀ ^s	409	G:C->A:T	Ile -> Ile
CW3	+	Tc ₂₀ ^s	414	G:C->A:T	Gly -> Asp (c)
CW4	+	Tc ₂₀ ^r Tc ₄₀ ^s	464	G:C->A:T	Glu -> Lys (c)
CW2	+	Tc ₂₀ ^s	601	G:C->A:T	Leu -> Leu
CW5	+	Tc ₂₀ ^r Tc ₄₀ ^s	613	G:C->A:T	Gly -> Ser (c)
CW6	+	Tc ₂₀ ^s	423	G:C->T:A	Gly -> Val (nc)
CW4	+	Tc ₂₀ ^s Tc ₄₀ ^s	431	G:C->T:A	Ala -> Ser (c)
CW7	+	Tc ₂₀ ^s	438	G:C->T:A	Ala -> Asp (nc)
CW8	+	Tc ₂₀ ^s	570	G:C->T:A	Pro -> Gln (nc)
CW9	+	Tc ₂₀ ^s Tc ₄₀ ^s	590	G:C->T:A	Leu -> Ile (c)
CW10	+	Tc ₂₀ ^s	420	G:C->C:G	Thr -> Arg (nc)

Nos résultats démontrent que l'adduit C8-G est spécifique des substitutions de paires de bases, comme l'était le N2-G; en effet, si l'on tient compte des 12% de mutants faibles obtenus avec le C8-G au cours de nos expériences de mutagenèse, on peut estimer à 90% la proportion de substitutions induites par cet adduit. Comme précédemment, les substitutions sont principalement de deux types : G en A (5/11) et G en T (5/11) avec un rapport similaire à celui du N2-G (45%).

D'autre part, nous avons séquencé 3 mutants faibles (CW4, 5 et 9) afin de vérifier qu'ils présentent tous des substitutions de paires de bases; effectivement, sur les 4 mutations identifiées on obtient 2 G en A et 2 G en T; de plus, la proportion transitions/transversions est la même que celle observée parmi les mutants Tc₂₀^S; ceci nous permet de confirmer que le choix de mutants forts pour le séquençage n'introduit pas de biaisage sur la proportion des différentes substitutions identifiées.

La seule délétion observée correspond à la perte d'un doublet de paires de bases GA en 380-383 (CW1), au niveau du site BamHI (375-380) du fragment 6S. Cette mutation pourrait être une conséquence de la construction du vecteur qui utilise une étape de ligation au niveau de ce site de restriction (modification ciblée sur le 6S). Mais cette mutation se trouve également dans une séquence présentant deux doublets GA successifs (380-383); il semble donc plus probable que cette délétion soit survenue selon le mécanisme de Streisinger, également impliqué dans l'apparition des délétions induites par le N2-G.

De l'ensemble de ces résultats, il apparaît que la mutagenèse observée avec le C8-G est similaire à celle induite par le N2-G. A ce niveau, il est important de rappeler que l'adduit C8-G est assez peu mutagène et ceci nous oblige à prendre en considération toute autre lésion éventuellement présente sur le plasmide au cours de nos expériences de mutagenèse. En ce qui concerne les adduits N2-G et N6-A, nous avons déjà démontré qu'ils n'intervenaient pas dans la mutagenèse observée avec le C8-G et ceci en raison de leur faible proportion; mais la modification de l'ADN *in vitro* par l'Ac-4HAQO peut induire la formation de sites apuriques (sites AP) (Menichini *et al.*, 1989). Ces sites AP sont particulièrement mutagènes et spécifiques des transversions G en T (Schaaper *et al.*, 1983); cette forte mutagenicité des sites AP pourrait donc interférer avec la mutagenèse induite par le C8-G et rendre compte des G en T observés ici. C'est pourquoi nous avons cherché à démontrer l'implication éventuelle des sites AP dans la mutagenèse induite aussi bien par le C8-G que par le N2-G, notamment parce que les transversions G en T induites par ces deux adduits n'ont jamais été décrites précédemment avec le 4NQO.

C. SITES APURINIQUES ET MUTAGENESE INDUITE PAR LE 4NQO

Lorsqu'une base est modifiée par un cancérigène chimique, la liaison N-glycosidique est parfois fragilisée; la base portant le cancérigène peut se détacher de l'ADN et créer ainsi un site apurinique (site AP). Ce phénomène s'observe principalement lorsque le cycle imidazole des bases puriques est modifié; c'est le cas par exemple des adduits formés en N7 de la guanine par les agents alkylants ou le benzopyrène-diol-époxyde et l'aflatoxine B1 (Drinkwater *et al.*, 1980; King *et al.*, 1979; Stark *et al.*, 1979). Les sites AP sont à l'origine d'une mutagenèse spécifique et dépendante des fonctions SOS; en effet, il a été démontré que face à ce type de lésion, l'ADN polymérase incorpore principalement une adénine; si le site dépuriné était une guanine, la mutation créée est alors une transversion G en T (Schaaper *et al.*, 1983; Kunkel, 1984; Loeb, 1985).

La proportion de G en T que nous observons étant importante aussi bien pour le N2-G que le C8-G, il nous fallait déterminer si ces transversions n'étaient pas dues aux sites AP apparus sur le plasmide au cours de la modification chimique et donc avant transformation bactérienne; dans ce cas, les G en T observés ne seraient plus spécifiques de l'adduit considéré.

Le pouvoir mutagène des sites AP a été étudié par Bichara dans le système que nous utilisons; pour 1 site AP par pBR322, la Fm observée est de 0,2%, soit $(MCS)_{av}AP = 8$ lorsque la cible de mutagenèse choisie est le gène Tc (avec $(MCS)_{av}AP = MCS$ moyen des sites AP). Si l'on compare cette valeur avec le $(MCS)_{av}$ des adduits du 4NQO, on constate que les sites AP sont respectivement 2 fois et 6 fois plus mutagènes que le N2-G et le C8-G. Il est donc important de connaître le nombre de sites AP présents sur les plasmides modifiés que nous avons utilisés.

Les travaux de l'équipe d'Abbondandolo, effectués en collaboration avec notre groupe, ont permis de purifier des plasmides sous forme superenroulée et de les modifier par l'Ac-4HAQO; par action d'une AP endonucléase, les sites AP créés donnent des cassures simples brins dont le nombre peut être estimé par électrophorèse sur gel d'agarose. Leurs résultats ont permis de calculer qu'un plasmide modifié par l'Ac-4HAQO à 50% en N2 et 30% en C8 de la guanine comporte au maximum 1 site AP pour 50 lésions (dont 25 adduits N2-G et 15 C8-G) (Menichini *et al.*, 1989). Nous n'avons pas d'information sur l'adduit responsable de la formation de ce site AP; en supposant que les deux adduits soient capables de donner des sites AP, nous considérons le cas le plus extrême à savoir : le N2-G seul responsable des sites AP lorsque nous étudierons la mutagenèse du N2-G, ou le C8-G seul responsable des sites AP lorsque nous étudierons la mutagenèse du C8-G; à partir du résultat décrit plus haut, notre façon de calculer donne : 1 site AP pour 25 adduits N2-G ou 1 site AP pour 15 adduits C8-G.

Les mutations induites par l'adduit N2-G ont été déterminées à partir de plasmides dont le taux moyen de modification est de 55 lésions par pBR322 (voir Tableau III, p.51) soit 42 adduits N2-G (modification à 75% en N2 de la guanine). Pour ces 42 adduits, 1,7 sites AP pourraient apparaître sur le plasmide (1 pour 25) soit 0,47 sites AP par gène Tc; le $(MCS)_{av}AP$ étant de 8 (cible de mutagenèse=gène Tc), 0,47 sites AP donnent une Fm de 0,37%. La mutagenèse induite par un plasmide portant 55 adduits est de 3,8% (Fig.13, p.47) soit 10 fois plus que celle induite par les sites AP éventuellement présents sur ce plasmide.

Pour l'adduit C8-G, les plasmides utilisés portent 6,8 lésions par fragment 6S, soit 6,1 adduits C8-G (90%). Ces 6,1 adduits pourraient donner 0,4 sites AP (1 pour 15). Lorsque la cible de mutagenèse choisie est le fragment 6S, le $(MCS)_{av}AP$ est de 12 ce qui donne une Fm de 0,49% pour 0,4 sites AP par 6S. La mutagenèse obtenue avec ces plasmides modifiés en C8 est de 1,09% soit 2 fois plus que celle induite par les sites AP éventuellement créés par les adduits C8-G.

De ces différents calculs, nous pouvons déduire que les sites AP éventuellement présents sur les plasmides avant transformation bactérienne n'induisent pas plus de 8 à 9% de la mutagenèse observée avec l'adduit N2-G et ceci dans le cas le plus défavorable. Les transversions G en T identifiées sont donc bien spécifiques de l'adduit N2-G.

Pour le C8-G, nos calculs semblent amener une interprétation différente; en effet, si les sites AP sont responsables de la moitié de la mutagenèse observée, la totalité des G en T obtenus avec le C8-G pourrait être induite par ces sites AP créés au cours de la modification chimique. L'origine des sites AP n'est pas déterminée et nous avons considéré le cas le plus extrême, mais certains arguments semblent appuyer notre calcul théorique. D'une part, l'adduit C8-G est instable en milieu faiblement basique; en effet, un composé C8-G avec ouverture du cycle imidazole a été identifié (*ring-opened* dGuo-C8-AQO; Fig.3, p.12) (Bailleul *et al.*, 1985); d'autre part, le C8-G semble être l'adduit responsable des cassures simples brins observées sur gradient alcalin d'ADN modifié *in vivo* par le 4NQO (Edwards *et al.*, 1987; Bailleul *et al.*, 1989); de plus, ces cassures simples brins proviennent probablement de la fragilisation des sites AP instables en milieu basique (Mirzayans *et al.*, 1988). Il est donc vraisemblable que l'origine des sites AP soit effectivement l'adduit C8-G; les transversions G en T observées dans le système pBR322 ne seraient alors pas spécifiques du C8-G mais artéfactuelles. Les substitutions induites par le C8-G seraient donc essentiellement des transitions G en A.

La mutagenicité du C8-G est faible par rapport au N2-G; nous l'avons estimée 3 fois inférieure. Si les sites AP sont effectivement responsables de la moitié des mutations observées ici, le $(MCS)_{av}$ du C8-G, spécifique des G en A, peut être divisé par 2 et passer de 1,1 à 0,55, mutagenicité comparable à celle du C8-AF qui induit principalement des G en T. L'adduit N2-G serait alors 6 fois plus mutagène que le C8-G. Au niveau de la

mutagénèse globale induite *in vivo* par le 4NQO, que l'on tienne compte ou pas de l'observation précédente, on obtient un résultat tout à fait significatif à savoir que l'adduit N2-G est responsable de 85 à 90% des mutations induites par le 4NQO; ceci s'explique par la très forte mutagénicité du N2-G mais aussi par le fait que cet adduit représente 50% des lésions présentes *in vivo*. Ce résultat implique que la mutagénèse induite par le 4NQO doit être comparable à celle du N2-G et que la proportion de transversions G en T induite *in vivo* par ce cancérigène est probablement importante.

A partir de nos résultats et de la répartition des différents adduits *in vivo*, il est possible de calculer la proportion des différentes mutations induites par le 4NQO; *in vivo*, on devrait observer :

- 13 à 14% de délétions
- 40 à 43% de transitions G en A
- 37 à 40% de transversions G en T
- 6 à 7% de transversions G en C

Nous ne pouvons pas préciser la spécificité mutationnelle de l'adduit C8-G mais comme l'indique le calcul précédent, l'induction ou non de transversions G en T par cet adduit peu mutagène n'a pas d'importance sur la mutagénèse que l'on devrait observer *in vivo* avec le 4NQO. En ce qui concerne l'adduit N2-G, principal responsable de la mutagénèse, nous avons démontré qu'il est spécifique des transitions G en A et des transversions G en T, induites dans les mêmes proportions. On peut donc se demander pourquoi ce type de transversion n'a jamais été décrit avec le 4NQO; pour tenter de répondre à cette question, nous allons maintenant décrire rapidement les différents systèmes précédemment utilisés pour l'étude de la mutagénèse induite par ce cancérigène.

D. MUTAGENESE INDUITE PAR LE 4NQO

La mutagénèse induite par le 4NQO a toujours été étudiée après traitement de la bactérie entière par le précancérigène; le 4NQO est alors métabolisé dans la cellule et se fixe sur les différents sites nucléophiles cellulaires dont l'ADN. Les premières études ont été réalisées dans les systèmes dits de réversion où l'on observe uniquement le retour au phénotype sauvage d'une bactérie ou d'un phage portant une mutation ponctuelle sur un gène particulier. Lorsque la séquence nucléotidique du site muté est connue, il est possible de déterminer la nature de la mutation permettant la réversion.

En 1971, Ishizawa observait que la mutagénèse induite par le 4NQO dans le locus *rII* du phage T4 résultait essentiellement de transitions G en A (Ishizawa & Endo, 1971). A l'époque, rien n'était connu sur la nature moléculaire des lésions induites et le principal

intérêt de ce résultat était de démontrer que le 4NQO se fixe essentiellement sur des paires de bases G:C. Il est important de souligner qu'aucune souche utilisée ne permettait de visualiser des transitions G en T.

Dans le test d'Ames qui observe le retour à la prototrophie de *Salmonellae typhimurium* devenues exigeantes en histidine, le 4NQO fut étudié grâce à 4 souches : TA98, TA100, TA1536 et TA1537. Sur ces 4 souches, la seule capable de détecter des substitutions (TA100) n'est réversible que par une transition G en A. De nouveau, les G en T n'étaient pas visualisables; il fut conclu que le 4NQO induisait principalement des G en A mais aussi des délétions de doublets GC dans la souche TA98 (Ames *et al.*, 1973; Mac Coy *et al.*, 1981).

Enfin, un autre système de réversion appliqué à la Levure sur le gène de l'iso-1-cytochrome c, permet à Prakash de visualiser des G en A mais aussi une proportion significative de transversions G en T; aucune mutation de l'adénine ne fut observée alors que certaines souches utilisées permettaient de les détecter (Prakash *et al.*, 1974).

Il apparaît donc clairement que l'interprétation des résultats obtenus dans ces différents systèmes de réversion est limitée puisque tous les types de mutations ne peuvent être visualisés, notamment les transversions G en T qui ne sont observées que par Prakash mais chez l'Eucaryote. Il est également important de signaler que ces systèmes de réversion n'observent la mutagénèse induite que sur un nombre très restreint de sites; de plus, il est difficile d'obtenir, avec ces systèmes, une estimation relative des différentes mutations observées; en d'autres termes, chaque type de mutation est étudié dans une souche particulière et la proportion des différentes mutations induites ne peut être déterminée. D'autre part, la nature exacte des lésions prémutagènes formées sur l'ADN n'est pas déterminée et le biaisage introduit peut être important; c'est en effet le cas dans les études du N-Aco-AAF par le système d'Ames (Ames *et al.*, 1972; Mac Cann *et al.*, 1975) : alors que l'on devrait observer la mutagénèse induite par l'adduit C8-AAF, il a été démontré que les résultats obtenus correspondaient à l'adduit C8-AF et cela en raison de la déacétylation du N-Aco-AAF au cours du traitement de la bactérie (Salles *et al.*, 1983; Bichara & Fuchs, 1985).

Le système mis au point dans *E.coli* par l'équipe de J.H. Miller semble plus adapté à l'étude du 4NQO; il s'agit d'un système de mutagénèse en avant mais différent de celui que nous utilisons puisqu'il est limité à la visualisation des substitutions et ne détecte que les codons stop créés par le mutagène étudié. En effet, ce système mesure la fréquence d'apparition de codons ambre (TAG) et ochre (TAA) sur le gène du répresseur LacI porté par un épisode. Lorsqu'un codon non sens apparaît, le répresseur LacI est tronqué; le gène *lacZ* n'est plus réprimé et induit le phénotype Lac⁺. L'identification et la localisation de la mutation induite repose sur l'analyse de la taille du répresseur tronqué (Coulondre & Miller, 1977-a). Sur les 300 codons du gène, 90 peuvent donner un codon non sens par substitution d'une des bases du triplet : 30 sites par un G en A, 23 par un G en T et 3 par

un G en C, les 34 autres codons concernant des thymines et des adénines (Miller J.H. *et al.*, 1978). Après modification de la bactérie *in vivo* par le 4NQO, Miller observe 90% de G en A contre 10% de G en T, pas de G en C et aucune mutation sur l'adénine (Coulondre & Miller, 1977-b). Le seul désaccord entre les résultats obtenus dans ce système et les nôtres repose donc sur la proportion de G en T mais nous reviendrons sur ce point.

Si l'on considère les mutations peu représentées avec le 4NQO, on constate que dans les deux systèmes capables de détecter les mutations de l'adénine (Prakash, Miller), aucune substitution n'est repérée; il en est de même avec les transversions G en C; ces deux résultats sont tout à fait en accord avec ce que nous observons sur le pBR322. En ce qui concerne les délétions, on peut remarquer que les -GC obtenus dans la souche TA98 du test d'Ames n'apparaissent pas dans nos résultats. Nous avons démontré que le N2-G n'induisait pas de -GC dans le site *NarI* du fragment 6S et les travaux de Bintz ont confirmé ce résultat. Dans la souche TA98, la séquence à réverter n'est pas un site *NarI* mais une séquence répétitive constituée de 4 doublets GC (Isono & Yourno, 1974); les -GC observés avec le 4NQO résultent donc probablement d'une mutagenèse de type Streisinger ce qui est tout à fait en accord avec nos résultats.

Le seul désaccord entre ces différents résultats et les nôtres reste la faible proportion de G en T observés dans le système LacI (10%) alors que ces transversions représentent près de la moitié des substitutions induites sur le pBR322. Cependant, les conditions expérimentales sont différentes : nous étudions les adduits du 4NQO formés *in vitro*, uniquement sur l'ADN; Miller utilise le 4NQO et traite la bactérie entière. Certains paramètres du système LacI pourraient donc expliquer la différence de résultats observée :

- le 4NQO est métabolisé dans la bactérie et modifie également l'ARN et les protéines, les conséquences de ces modifications chimiques n'étant pas connues.

- il est impossible de connaître le taux de lésions et la proportion des différents adduits n'est pas déterminée.

- le niveau d'induction des fonctions SOS n'est pas contrôlable; elles sont induites uniquement par les adduits du 4NQO qui se fixent sur le chromosome bactérien.

- seule une faible proportion des substitutions effectivement induites sur le gène peut être repérée; pour les G en T notamment, sur les 300 codons de *lacI* (900 nucléotides) seulement 30 guanines permettent de visualiser ce type de mutation.

Ces différentes observations pourraient donc rendre compte de l'inaptitude du système LacI à détecter les transversions G en T induites par l'adduit N2-G ce qui, en contrepartie, provoque une surestimation des transitions G en A. Mais il existe un autre argument majeur que je vais décrire dans le chapitre suivant; en effet, avec le système

pBR322 nous pouvons tenir compte de la séquence nucléotidique où se trouve la lésion, ce qui n'est possible que si l'on dispose d'un nombre important de sites de mutagenèse.

V. INFLUENCE DE LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE SUR LA MUTAGENESE

L'idée que la mutabilité d'un site puisse être influencée par la séquence locale de l'ADN a été proposée dès 1961 par Benzer pour expliquer l'existence de «points chauds» de mutagenèse dans le locus *rII* du phage T4 (Benzer, 1961). Depuis, l'influence de la séquence a été mise en évidence dans la mutagenèse spontanée, en particulier au niveau des séquences répétitives où l'on observe fréquemment des délétions (Streisinger *et al.*, 1966; Schaaper *et al.*, 1986; Ripley *et al.*, 1986). La mutagenèse induite par certaines lésions peut également subir une influence de la séquence; c'est le cas notamment de l'adduit C8-AAF, spécifique des délétions de doublets GC dans les séquences *NarI* du pBR322 (Koffel-Schwartz *et al.*, 1984). Cette influence à longue distance de la séquence autour de la lésion concerne généralement les délétions.

Récemment, une influence plus locale de la base située directement en 5' de la lésion a été décrite pour les substitutions induites par certains agents alkylants. En effet, il a été démontré qu'une guanine présente dans une séquence 5''Pu-G (Pu pour purine) est 8 fois plus mutable par traitement au MNNG que si elle se trouve dans une séquence 5''Py-G (Py pour pyrimidine) (Burns *et al.*, 1987)

A l'aide de nos données, il est possible de regarder si la mutagenèse induite par le 4NQO subit une influence de la séquence nucléotidique large ou locale au niveau des adduits N2-G et C8-G. Pour cela, deux approches sont possibles; nous analyserons :

- A. la répartition des mutations sur le fragment 6S (influence à longue distance)
- B. la nature de la base directement voisine de la mutation (influence locale)

A. SPECTRE DE MUTAGENESE DES ADDUITS N2-G ET C8-G

La représentation des mutations induites sur le fragment 6S par le N2-G et le C8-G permet d'établir le spectre de mutagenèse de ces deux adduits (Fig.14) et de visualiser l'existence ou non de séquences «chaudes» (*Hot spots*) de mutagenèse.

On remarque que les mutations sont réparties sur l'ensemble du 6S et ceci pour les deux adduits; en effet, on observe 19 mutations en 15 sites pour le N2-G et 12 mutations en 12 sites pour le C8-G. Il est possible de calculer le nombre de mutations par site et l'on obtient respectivement 1,3 et 1 pour le N2-G et le C8-G; ces valeurs sont comparables au spectre du C8-AF qui présente 1,2 mutations par site et pour lequel il n'existe pas de séquence

N2-G

5'-BamHI

CTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGGCATCACCGGCCACAGGTGGCGTGGCTGGCCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTA

C8-G

TGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTGGGCCCATCTCCTTGCATGCACCATTCTTGGCGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCG

Sall-3'

■ Délétion

□ G en A

▨ G en T

▩ G en C

Figure 14 : Spectre de mutagenèse des adduits N2-G et C8-G.

chaude. Au contraire, pour l'adduit C8-AAF, on observe 6,1 mutations par site; les points chauds de mutagenèse sont localisés au niveau des séquences répétitives et non répétitives de type *NarI* (Koffel-Schwartz *et al.*, 1984).

En fonction de ces résultats, nous pouvons conclure qu'il n'existe aucun point chaud de mutagenèse aussi bien pour l'adduit N2-G que pour le C8-G. Si l'on regarde uniquement les délétions, on constate une certaine influence de la séquence puisque toutes ces mutations concernent des séquences répétitives ou non répétitives de type *NarI*; comme nous l'avons décrit précédemment, cette influence de la séquence peut s'expliquer par le mécanisme de Streisinger. Cependant, contrairement au C8-AAF spécifique des délétions, on ne peut pas parler de point chaud de mutagenèse puisque les délétions ne représentent que 10 à 15% des mutations induites par les adduits N2-G et C8-G du 4NQO.

B. INFLUENCE DE LA SEQUENCE 5' PU-G SUR LA MUTAGENESE

Nous allons maintenant nous intéresser à la base immédiatement à proximité de la lésion. La base en 3' et en 5' de chaque site de mutation a été examinée pour les deux adduits du 4NQO et ceci afin de savoir s'il existe une base voisine préférentielle dans le site de mutagenèse observé (Tableau V).

Tableau V. Bases voisines des mutations induites par les adduits N2-G et C8-G du 4NQO. Ts : transitions (G en A); Tv : transversions (G en T, G en C); Pu : purines (G,A); Py : pyrimidines (C,T).

		Base en 3'		Base en 5'	
		Pu	Py	Pu	Py
Adduit N2-G	Ts	4	2	4	2
	Tv	2	5	7	-
Adduit C8-G	Ts	4	1	3	2
	Tv	1	5	3	3

En 3' de la lésion et pour les deux adduits N2-G et C8-G, on observe aussi bien des guanines et des adénines (Pu) que des thymines et des cytosines (Py); de plus, la séquence nucléotidique du fragment 6S contient à peu près la même proportion de séquences G-Pu3' que de G-Py3' (48% et 52%). Nous pouvons donc conclure que la base en 3' de la lésion prémutagène n'exerce aucune influence sur la mutagenèse induite aussi bien par l'adduit N2-G que par le C8-G.

En 5' de la lésion et pour l'adduit N2-G, on remarque que 11 mutations sur 13 se trouvent dans une séquence 5' Pu-G; il semble donc que la mutagenèse induite par le N2-G apparaisse préférentiellement dans cette séquence. Si l'on regarde chaque type de mutation, on constate une influence très forte de la base en 5' de l'adduit pour les transversions puisque la totalité de ces mutations sont dans une séquence 5' Pu-G (7/7); ce phénomène disparaît pour les transitions (4/6). A ce niveau, on peut se demander si cette particularité ne résulte pas d'un biaisage dû au système utilisé ou au mode de sélection des mutants ou même à la séquence du gène Tc. Si maintenant on effectue la même analyse sur la mutagenèse induite par l'adduit C8-G, étudié dans le même système avec le même type de sélection, on n'observe aucune influence de la base directement en 5' de l'adduit. Ceci confirme que le phénomène observé avec l'adduit N2-G n'est pas dû à un biaisage de sélection et reste tout à fait valable.

Certaines vérifications nous ont semblé nécessaires pour exclure d'autres sélections dues au gène Tc, particulièrement parce que notre collection de mutants n'est pas très importante. Pour cela, nous avons vérifié que les séquences 5' Pu-G et 5' Py-G étaient en même proportion sur le fragment 6S. Si l'on tient compte de la dégénérescence du code génétique, sur les 172 guanines du fragment 6S, 127 peuvent donner une mutation impliquant un changement d'acide aminé; sur ces 127 guanines, 72 sont dans une séquence 5' Pu-G et 55 dans une séquence 5' Py-G; de plus, 90% d'entre elles permettent de visualiser tous les types de substitutions, qu'il s'agisse de transitions ou de transversions. Enfin, nous avons constaté que cette influence de la base en 5' de la lésion n'existe pas pour l'adduit C8-AF, étudié dans le même système et spécifique des transversions G en T (Bichara & Fuchs, 1985).

D'après ces différents résultats, nous pouvons conclure que la base voisine n'influe pas sur l'apparition des transitions G en A; au contraire, la séquence 5' Pu-G semble être un facteur important pour la conversion de l'adduit N2-G en une mutation de type transversion.

L'adduit N2-G étant responsable de plus de 80% de la mutagenèse induite *in vivo* par le 4NQO, on peut se demander si l'influence de la base voisine du N2-G sur sa conversion en transversion ne peut expliquer la différence observée entre la mutagenèse obtenue sur

le pBR322 et sur le gène *lacI*. Après examen de la séquence de *lacI* (Farabaugh, 1978; Miller J.H. *et al.*, 1978), il apparaît que les 30 codons capables de mettre en évidence les transitions G en A présentent tous la séquence 5'Py-G; d'après nos résultats, la base en 5' n'influe pas sur l'apparition de ce type de substitution et ces 30 sites peuvent être considérés comme potentiels pour la visualisation des G en A. Au contraire, sur les 26 sites permettant de détecter les transversions G en T ou G en C, on n'observe que 7 sites mutables présentant la séquence 5'Pu-G. Comme cette séquence semble nécessaire à la visualisation de ce type de substitution, le gène *lacI* ne présenterait que 7 sites potentiels pour les transversions contre 30 sites pour les transitions induites par l'adduit N2-G.

Dans le cas du C8-G, la base en 5' n'influe pas et tous les sites présentent la même mutabilité. Cependant, le C8-G est beaucoup moins mutagène que le N2-G (3 à 6 fois) et les transversions qu'il pourrait induire ne représenteraient qu'une faible proportion de la mutagenèse globale du 4NQO (5% au maximum).

Le facteur $\frac{4}{30}$ existant entre le nombre de sites potentiels pour la visualisation des transitions ou des transversions pourrait donc bien rendre compte de la faible proportion de G en T observés sur le gène *lacI* par J.H. Miller.

Jusqu'à présent, le rôle possible de la base en 5' d'un adduit sur la mutagenèse qu'il induit a été mis en évidence uniquement avec les agents alkylants. En effet, avec le N-éthyl-N-nitrosourée (ENU), le MNNG et le N-méthyl-N-nitrosourée (MNU), on observe respectivement 5, 7 et 10 fois plus de transitions G en A dans les séquences 5'Pu-G que dans les séquences 5'Py-G (Burns *et al.*, 1987 et 1988; Glickman *et al.*, 1987). Ce phénomène n'est cependant pas généralisable à tous les alkylants puisqu'il n'est pas observé avec l'éthyl méthanesulfonate (EMS) et le diméthylsulfonate (DMS) (Burns *et al.*, 1986 et 1987; Kohalmi & Kunz, 1988).

L'adduit N2-G n'a rien en commun avec les lésions induites par les alkylants; la seule similitude réside dans la spécificité de ces lésions à induire des substitutions puisque les alkylants sont spécifiques des transitions G en A et le N2-G spécifique des G en A mais aussi des G en T. L'influence de la base voisine observée avec le N2-G est donc d'autant plus intéressante qu'elle n'a jamais été mise en évidence pour un adduit volumineux. Cependant, il faut rappeler que les études moléculaires de la mutagenèse induite spécifiquement par un seul type d'adduit sont peu nombreuses. Les résultats dont nous disposons concernent uniquement des adduits portés en C8 de la guanine : le C8-AF, le C8-AAF et l'adduit du GluP3. Nous avons analysé les substitutions induites par le C8-AF et le GluP3 : on ne constate aucune influence de la base voisine sur la mutagenèse (Bichara & Fuchs, 1985; Hebert *et al.*, 1988). Cette situation est tout à fait comparable à ce que nous obtenons avec le C8-G du 4NQO; il semble donc que le phénomène observé avec le N2-G ne concerne pas les adduits présents en C8 de la guanine.

L'adduit N2-G du 4NQO est la seule lésion volumineuse de type N2 étudiée jusqu'à présent; il serait donc intéressant de savoir, par l'étude d'autres adduits N2, si l'influence de la base en 5' que nous observons est caractéristique de ce type de lésion ou spécifique de l'adduit N2-G du 4NQO.

Il est intéressant d'analyser nos résultats d'une manière différente; en effet, on constate que sur 13 substitutions identifiées, la plupart (11/13) se trouvent dans une séquence 5'Pu-G (4 G en A et 7 G en T); seulement 2 mutations sont en 5'Py-G (2 G en A). A partir de ces résultats, il est possible de calculer comme précédemment le $(MCS)_{av}$ de la lésion N2-G mais limité à un type de sites de mutagénèse; en effet, nous allons pouvoir différencier la mutagénèse induite par le N2-G dans les séquences 5'Pu-G et 5'Py-G. La cible de mutagénèse est alors constituée dans un cas, des 72 séquences 5'Pu-G et dans l'autre cas des 55 séquences 5'Py-G du fragment 6S. Le calcul fait également intervenir le nombre de mutants obtenus dans l'une ou l'autre séquence par rapport au nombre total de substitutions identifiées, soit 11/13 en 5'Pu-G et 2/13 en 5'Py-G. Nous allons calculer le $(MCS)_{avPu}$ et le $(MCS)_{avPy}$ à partir du $(MCS)_{av}$ global du N2-G arrondi à 4 et obtenu sur les 127 guanines du fragment 6S; la valeur des MCS n'est pas importante, seul le rapport des 2 valeurs nous intéresse ici :

$$(MCS)_{avPu} = (MCS)_{av} \cdot 11/13 \cdot 127/72 = 6$$

$$(MCS)_{avPy} = (MCS)_{av} \cdot 2/13 \cdot 127/55 = 1,4$$

De ce calcul nous pouvons déduire que les séquences 5'Pu-G sont environ 4 fois plus mutagènes que les séquences 5'Py-G. De ce point de vue, cette mutagénèse est comparable à celle des agents alkylants pour lesquels on observe également une plus grande mutabilité des séquences 5'Pu-G; mais dans le cas de l'adduit N2-G, le $(MCS)_{avPu}$ est plus important uniquement parce qu'en plus des transitions on observe également des transversions; en effet, sans les G en T, les séquences 5'Pu-G et 5'Py-G auraient la même mutabilité.

Pour les agents alkylants, les auteurs ont proposé que l'influence de la base en 5' traduisait essentiellement la plus grande réactivité de l'oxygène 6 des guanines présentes dans une séquence 5'Pu-G; leur hypothèse s'appuie sur l'influence de la séquence nucléotidique sur le potentiel électrostatique et sur l'accessibilité du site réactif (O⁶ de la guanine dans ce cas) (Burns *et al.*, 1987).

Pour l'adduit N2-G du 4NQO, le phénomène semble plus complexe puisque l'on constate une influence de la séquence uniquement sur l'apparition des transversions. Si la distribution préférentielle des adduits N2-G dans les séquences 5'Pu-G était à l'origine de la mutagénèse particulière observée dans ces sites, le phénomène serait également observable pour les transitions; ce n'est pas le cas ici puisqu'on obtient des G en A aussi bien dans les 5'Pu-G que dans les 5'Py-G. Des travaux réalisés par l'équipe de I. Walker confirment ce

raisonnement; en effet, l'étude de la distribution des adduits N2-G et C8-G sur l'ADN ne montre aucune influence de la base en 5' ou en 3' de la guanine sur la fixation du cancérogène, aussi bien pour l'adduit N2-G que C8-G (Panigrahi & Walker, 1989). Ceci permet d'exclure une origine chimique du phénomène observé comme il l'avait été proposé pour les alkylants.

Puisque les séquences 5'Pu-G ne sont pas plus réactives que les 5'Py-G, l'explication doit se trouver dans une différence de «traitement» biologique (traduction de *processing*) de la lésion N2-G par certaines enzymes cellulaires, en fonction de la séquence portant l'adduit. Il faut rappeler que les fonctions SOS de la bactérie interviennent dans le traitement des adduits N2-G et C8-G, contrairement aux lésions induites par les agents alkylants; ces fonctions interviennent principalement à deux niveaux : la réparation de la lésion par le système UvrABC et la conversion de l'adduit en mutation par la machinerie répliquative.

Pour la réparation, un raisonnement similaire au précédent peut être fait pour écarter la réparation comme seule explication du phénomène observé; en effet, si les séquences 5'Pu-G étaient plus rapidement ou plus efficacement réparées que les 5'Py-G, on observerait effectivement plus de mutations en 5'Pu-G mais il n'y aurait pas de raison de ne trouver aucune transversion dans les séquences 5'Py-G. Une réparation différentielle en fonction de la séquence est donc peu probable; cependant, si elle existe, elle ne peut expliquer que la nature des mutations induites varie suivant la séquence impliquée.

Il est tentant de poursuivre l'interprétation en incriminant plutôt le ou les mécanismes de conversion d'une lésion prémutagène en mutation. Cette hypothèse nous semble la plus probable puisqu'elle pourrait rendre compte de la mutabilité plus élevée des séquences 5'Pu-G mais aussi expliquer que l'incorporation du nucléotide face à la lésion puisse être différente selon la séquence d'ADN.

En effet, nos résultats pourraient signifier que dans une séquence 5'Py-G, l'ADN polymérase ne peut incorporer qu'une cytosine (sans apparition de mutation) ou une thymine (transition G en A) face à l'adduit N2-G; dans une séquence 5'Pu-G, l'enzyme pourrait appairer une cytosine ou une thymine comme précédemment mais aussi une adénine (transversion G en T); dans tous les cas, l'incorporation d'une guanine serait un événement rare (transversion G en C). On peut remarquer que l'enzyme, lorsqu'elle crée une mutation, dispose de deux bases (T et A) dans les séquences 5'Pu-G contre une seule (T) dans les 5'Py-G; ceci est une approche mécanistique qui permettrait de concevoir la plus grande mutabilité des sites 5'Pu-G.

Comme nous l'avons démontré précédemment, la conversion de l'adduit N2-G en mutation nécessite la présence des fonctions SOS de la bactérie; selon le modèle proposé par

Wood et Sedgwick (Wood & Sedgwick, 1986), on pourrait concevoir que l'ADN polymérase bloquée par l'adduit N2-G non codant fixe RecA activée, UmuD clivée et UmuC pour former un complexe réplcatif capable de «passer» la lésion en créant ou non une mutation; l'enzyme disposerait alors des 4 nucléotides qu'elle incorporerait selon la séquence nucléotidique :

-cytosine : incorporation légitime la plus fréquente quelle que soit la séquence; aucune mutation n'est créée

-guanine (G en C) : événement rare, ce qui est d'ailleurs généralisable à la majorité des adduits volumineux formés par les précancérogènes

-thymine (G en A) : incorporation possible quelle que soit la séquence

-adénine (G en T) : incorporation possible mais uniquement dans les séquences 5''Pu-G; la mutation est peut-être fixée dans ces séquences parce que la correction des erreurs d'appariement y est moins efficace; en effet, il a été remarqué que la base voisine de la base répliquée pouvait affecter la fidélité ou l'activité 3'-5' de correction des erreurs de l'ADN polymérase, cet effet étant plus marqué dans les séquences 5'Pu-Pu (Kunkel *et al.*, 1981).

Il ressort de notre analyse que le phénomène d'influence de la base en 5' n'est pas l'effet d'une fixation préférentielle du cancérogène ou de la réparation dans ces séquences; l'hypothèse la plus probable réside dans le traitement de la lésion qui autoriserait l'incorporation d'une adénine face à l'adduit mais uniquement dans les séquences 5''u-G; les fonctions SOS et notamment la protéine UmuC auraient un rôle à jouer; en effet, il est intéressant de remarquer à ce niveau que le mutant NW17 obtenu avec l'adduit N2-G mais sans induction des fonctions SOS de la bactérie est le seul présentant une transversion G en T dans une séquence 5'Py-G.

Les mécanismes exacts de conversion d'une lésion en mutation sont encore mal connus actuellement; cependant, il est peu concevable que la mutagénèse particulière observée dans les 5'Pu-G résulte d'un mécanisme spécifique de ces séquences. Il nous semble plus probable que le mécanisme de conversion des adduits volumineux en mutations soit modifié ou modulé par la conformation particulière éventuellement induite par le N2-G dans ces séquences; seule cette conformation permettrait l'incorporation d'une adénine face à la lésion d'où l'apparition de G en T uniquement dans les 5'Pu-G.

On peut donc se demander si le phénomène observé ici est généralisable aux lésions de type N2 induites par certains précancérogènes ou spécifique de l'adduit N2-G du 4NQO, peut-être en raison d'une conformation caractéristique adoptée par la séquence 5'Pu-G-N2AQO. Si ce phénomène est commun aux lésions N2, est-il spécifique des transversions G en T ou le type de mutation induite est-il uniquement fonction du cancérogène ?

Tous nos résultats ont été obtenus chez le Procaryote et il nous a semblé intéressant de regarder si ce phénomène d'influence de la séquence 5'Pu-G pouvait également apparaître chez l'Eucaryote et pour d'autres cancérogènes. Pour des raisons évidentes, aucun modèle d'étude n'existe chez l'Homme mais à partir de la littérature, il est possible d'analyser les événements mutationnels impliqués dans l'activation des principaux proto-oncogènes de la famille *c-ras* (*c-Harvey-ras*, *c-Ha-ras*; *c-Kirsten-ras*, *c-Ki-ras*; *c-N-ras*), activation observée dans 10 à 15% des tumeurs humaines (Bos *et al.*, 1985, 1987-a et 1987-b; Nishida *et al.*, 1987-a et 1987-b; Almogera *et al.*, 1988; Farr *et al.*, 1988; Neri *et al.*, 1988; Rodenhuis *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1988; Visvanathan *et al.*, 1988; Vogelstein *et al.*, 1988).

L'activation de ces proto-oncogènes résulte généralement d'une mutation ponctuelle dans les codons 12 ou 13 qui présentent tous les deux la séquence 5'Py-GGN aussi bien chez l'Homme que chez la Souris; seul le codon 12 de *N-ras* est une séquence 5'Pu-GGN. Il a été démontré qu'une mutation de la première guanine (5'Pu-G pour *c-Ha-* et *c-Ki-ras*) ou de la seconde (5'Pu-G) dans un de ces codons est capable d'activer *c-ras* (le codon 12 de l'oncogène viral est d'ailleurs AGA) (Fasano *et al.*, 1984; Seeburg *et al.*, 1984). Nous avons analysé les résultats obtenus sur 193 tumeurs humaines où *c-ras* est impliqué et il apparaît que la mutation activatrice se trouve dans une séquence 5'Pu-G dans 75, 80 et 90% des cas respectivement pour les proto-oncogènes *c-Ki-*, *c-N-* et *c-Ha-ras*. La mutation peut être une transition G en A ou une transversion G en T; 90% des G en A et 70% des G en T sont induites dans une séquence 5'Pu-G. Les cancérogènes éventuellement impliqués ne sont pas connus mais le 4NQO peut être exclu puisqu'il n'est utilisé qu'en laboratoire. Dans le modèle expérimental de la peau de souris où l'on observe l'apparition de tumeurs par action d'un cancérogène, *c-Ha-ras* est fréquemment impliqué (Balmain & Pragnell, 1983; Balmain *et al.*, 1984); dans ce cas, la mutation activatrice se trouve dans le codon 12 et concerne toujours la guanine contenue dans la séquence 5'Pu-G; elle peut être une transition G en A (alkylants) ou une transversion G en T (benzopyrène-diol-époxyde) (Bailleul *et al.*, 1988); on observe donc une mutabilité particulière de la guanine présente dans la séquence 5'Pu-G alors que les séquences 5'Py-G sont rarement impliquées; actuellement, aucune explication biologique ne peut rendre compte de ce phénomène.

Lorsque l'on traite la peau de souris avec le 4NQO, les tumeurs induites présentent également une activation de *c-Ha-ras*; sur 4 tumeurs obtenues, 2 ont été analysées et présentent une transition G en A dans la séquence 5'Pu-G du codon 12 (Bailleul *et al.*, 1988). Le codon 61 de *c-Ha-ras* ne peut être activé que par une transversion G en T; il n'a donc pas été analysé par ces auteurs car le 4NQO était connu comme induisant essentiellement des transitions; d'après nos résultats, ce type de mutation aurait probablement pu être identifié dans certaines tumeurs.

Le fait important reste que la mutagénèse observée sur les codons 12 et 13 des gènes *c-ras* se retrouve presque toujours dans une séquence 5'Pu-G alors qu'une mutation de la première base en 5'Py-G peut également activer le proto-oncogène. Ce phénomène résulte peut-être du «filtre protéique» au travers duquel on observe la mutagénèse induite sur ces gènes; cette mutation particulière permettrait alors la sélection naturelle de la cellule mutée en lui conférant un avantage de croissance (Varmus, 1984). Si ce n'est pas le cas, le phénomène que nous observons pourrait signifier qu'*in vivo* chez l'Eucaryote, les séquences 5'Pu-G présentent une plus grande mutabilité et ceci pour différents cancérrogènes. Selon le cancérrogène, la mutation induite pourrait être une transition G en A ou une transversion G en T. Pour certains composés comme les agents alkylants, on peut penser que la réactivité du site de fixation ait un rôle à jouer (Topal, 1988). Pour les précancérrogènes qui sont probablement impliqués dans l'apparition de certains cancers chez l'Homme, la cause serait plutôt le mécanisme de conversion de la lésion en mutation; bien que l'on connaisse peu de choses sur les mécanismes de mutagénèse chez l'Eucaryote, on pourrait penser que ce traitement particulier de la lésion dépendrait alors de la séquence nucléotidique et de la conformation locale induite par la lésion prémutagène.

CONCLUSION

L'utilisation du modèle de cancérogène ultime du 4NQO précédemment mis au point au laboratoire a permis la réalisation de cette étude; en effet, à l'aide de ce modèle, il a été possible d'obtenir une fixation préférentielle du cancérogène soit en N2 soit en C8 de la guanine et d'appréhender chez *E.coli* les principales propriétés biologiques de chacun des deux adduits majoritaires du 4NQO, le dGuo-N2-AQO ou N2-G et le dGuo-C8-AQO ou C8-G qui représentent respectivement 50 et 30% des lésions induites *in vivo* par le précancérigène.

Dans un premier temps, nous avons étudié la toxicité de ces adduits; il apparaît que l'adduit N2-G est particulièrement toxique, ce qui n'est pas observé avec le C8-G. Cette propriété du N2-G permet d'expliquer la toxicité élevée du 4NQO, d'autant plus que cet adduit est la lésion majeure *in vivo*. Il nous a été possible d'établir une corrélation entre la toxicité respective de ces deux adduits et la déformation de l'ADN qu'ils semblent induire; en effet, nos résultats sont tout à fait en accord avec l'hypothèse proposée par Galiègue-Zouitina et Bailleul et selon laquelle l'adduit N2-G, dont le noyau quinoléine est fixé sur un atome impliqué dans l'appariement G:C et serait localisé dans le petit sillon, provoquerait une déformation importante de la double hélice; en raison de cette conformation particulière au niveau de la lésion, la réplication ne peut s'effectuer et la polymérase est bloquée, ce qui permet d'expliquer la forte toxicité de l'adduit N2-G. La quinoléine de l'adduit C8-G, située au contraire dans le grand sillon, modifierait assez peu la conformation de l'ADN; *in vivo* effectivement, la réplication n'est pas bloquée et la toxicité observée est faible.

La rôle prédominant de l'adduit N2-G dans la mutagenèse est également observé; en effet, nous avons démontré que le N2-G est 3 à 6 fois plus mutagène que le C8-G et qu'il pouvait rendre compte de 85 à 90% de la mutagenèse induite *in vivo* par le 4NQO.

Ces résultats nous permettent d'affirmer que l'adduit N2-G du 4NQO peut être considéré comme le principal responsable des conséquences biologiques du 4NQO, l'adduit C8-G ne jouant pas un rôle important dans la toxicité et la mutagenicité de ce précancérigène. Pour le 4NQO, les propriétés intrinsèques de l'adduit formé sont donc déterminées par l'atome de la guanine sur lequel vient se fixer le noyau quinoléine.

En ce qui concerne le «traitement» biologique des deux principaux adduits, nous avons démontré le rôle important que pouvaient y jouer les fonctions SOS de la bactérie. En effet, le système UvrABC est capable d'exciser l'adduit N2-G et probablement le C8-G; de plus, la mutagenèse induite par ces deux adduits nécessite l'intervention de certains gènes *din* et nous avons démontré que la protéine UmuC était directement impliquée dans la conversion des lésions prémutagènes du 4NQO en mutation.

D'autre part, nous avons déterminé la nature des mutations induites par le N2-G

et le C8-G sur le pBR322 et il apparaît que ces deux adduits sont spécifiques des substitutions. En effet, les délétions ne représentent que 10 à 15% de la mutagenèse induite; on ne les observe que dans les séquences GC alternées et les séquences répétitives où le mécanisme général proposé par Streisinger peut rendre compte de leur apparition. En ce qui concerne les substitutions, il est probable qu'elles apparaissent selon le modèle de mutagenèse admis actuellement où RecA activée permet l'incorporation d'une base erronée face à la lésion non codante alors que UmuC et UmuD clivée autoriseraient la reprise de la réplication à partir de la mutation créée.

L'adduit C8-G est spécifique des transitions G en A; nous observons également des G en T dans les mêmes proportions mais il est probable que les sites apuriques créés *in vitro* au cours de la modification chimique du plasmide soient à l'origine de ces transversions et ceci d'autant plus que le C8-G est suspecté d'être le responsable de l'apparition de ces sites apuriques. Pour déterminer la spécificité mutationnelle de l'adduit C8-G, il serait donc important de déterminer l'aptitude de cette lésion à provoquer une dépurination de l'ADN.

Quant à l'adduit majeur N2-G, nous avons démontré qu'il était capable d'induire aussi bien des transitions G en A que des transversions G en T et ceci dans les mêmes proportions (45 à 50% des substitutions). Le N2-G étant particulièrement mutagène, nous avons estimé que ces transversions devaient représenter près de 40% de la mutagenèse induite *in vivo* par le 4NQO; ce résultat est tout à fait inattendu puisque le 4NQO a toujours été décrit comme induisant principalement des transitions G en A. Cependant, l'analyse des modèles utilisés précédemment pour étudier la mutagenèse du 4NQO nous a permis de comprendre pourquoi ces transversions n'avaient jamais été observées.

Notre étude permet également d'étudier l'influence de la nature moléculaire du cancérigène ultime sur les propriétés biologiques de l'adduit formé; en effet, nous pouvons comparer les caractéristiques des adduits C8-AF, C8-AAF et C8-G du 4NQO, de natures différentes mais présents tous les trois en C8 de la guanine. Alors que les adduits C8-G et C8-AF sont peu toxiques, peu mutagènes et semblent induire une faible déformation de l'ADN, le C8-AAF a été parfaitement décrit comme présentant des propriétés inverses. Si l'on considère les résultats obtenus avec le N2-G, on constate qu'il possède les mêmes caractéristiques que le C8-AAF, à savoir une toxicité et une mutagenicité importantes. Dans le cas des amines aromatiques, nos résultats confirment donc la corrélation déjà établie entre l'aptitude d'une lésion à déformer l'ADN et son pouvoir toxique et mutagène. La conformation imposée à la double hélice par un adduit serait donc l'élément clef responsable des propriétés biologiques de cette lésion de l'ADN.

Au cours de cette étude, nous avons également analysé la séquence voisine des mutations induites par les deux adduits du 4NQO. Il apparaît que la totalité des transversions G en T induites par le N2-G sont présentes dans une séquence 5'Pu-G. L'origine la plus probable de cette influence de la séquence semble impliquer l'étape de conversion de la lésion en mutation; nous avons proposé que l'adduit N2-G pourrait induire une conformation particulière des séquences 5'Pu-G; cette conformation donnerait alors à l'ADN polymérase la possibilité supplémentaire d'incorporer une adénine face à l'adduit d'où l'apparition d'une transversion G en T, mutagénèse apparemment impossible dans les séquences 5'Py-G.

Ce type d'influence de la séquence sur la mutagénèse induite par un adduit volumineux n'avait jamais été mis en évidence auparavant; de plus, notre étude est la seule qui analyse de façon précise les conséquences d'une lésion formée en N2 de la guanine. On peut donc se demander si le phénomène observé ici reste spécifique de l'adduit N2-G du 4NQO ou s'il existe également pour d'autres lésions de type N2 ou même pour d'autres adduits volumineux capables d'induire des substitutions et de provoquer une déformation importante de l'ADN.

Cette étude a été réalisée chez le Procaryote et il serait intéressant de déterminer si cette mutabilité particulière des séquences 5'Pu-G existe également chez l'Eucaryote; en effet, l'analyse de la littérature concernant l'activation par mutation ponctuelle des gènes *c-ras* impliqués dans certaines tumeurs, fait apparaître une prédominance de cette activation dans les séquences 5'Pu-G par rapport aux 5'Py-G.

Les connaissances que nous avons acquises sur les différences de propriétés de chacun des deux principaux adduits du 4NQO viennent souligner l'intérêt d'étudier un seul type de lésion au niveau moléculaire; les informations que l'on peut obtenir sont alors considérables et constituent une importante contribution à la compréhension des phénomènes mutagènes provoqués par les cancérogènes chimiques. Cette approche fondamentale est d'autant plus intéressante et indispensable qu'il est maintenant évident que la mutagénèse est un événement génétique impliqué dans l'apparition de nombreux cancers humains.

APPENDICE I

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

- 1. Souches bactériennes**
- 2. Milieux et tampons**

- 2.1. Milieux de culture bactérienne
- 2.2. Solutions et tampons usuels

II. METHODES

1. Techniques usuelles

- 1.1. Obtention d'ADN sec dépourvu de sels
- 1.2. Déprotéinisation de l'ADN
- 1.3. Minipréparation d'ADN plasmidique
- 1.4. Préparation d'ADN plasmidique
 - 1.4.1. Culture bactérienne
 - 1.4.2. Lyse bactérienne
 - 1.4.3. Précipitation de l'ADN au PEG
 - 1.4.4. Purification sur chlorure de césium
 - 1.4.5. Récupération et dosage de l'ADN plasmidique

2. Préparation du cancérogène ultime, l'Ac-4HA[2-³H]QO

3. Première stratégie de mutagenèse : modification du plasmide entier

- 3.1. Modification chimique du plasmide
- 3.2. Détermination du nombre d'adduits par plasmide
- 3.3. Détermination de la proportion des différents adduits
 - 3.3.1. Hydrolyse enzymatique de l'ADN
 - 3.3.2. Analyse des hydrolysats par CLHP
- 3.4. Transformation bactérienne
 - 3.4.1. Transformation classique
 - 3.4.2. Transformation après induction du système SOS

3.5. Sélection des transformants et isolement des mutants Tc sensibles

3.6. Sélection des plasmides mutés sur le fragment 6S : cartographie par délétion

3.6.1. Principe

3.6.2. Obtention de doubles transformants

3.6.3. Test de recombinaison interplasmidique

4. Seconde stratégie de mutagénèse : modification ciblée sur le fragment 6S

4.1. Construction de plasmides modifiés en C8 de la guanine sur le fragment 6S

4.1.1. Séparation et récupération des fragments 16S et 6S

4.1.2. Modification chimique du fragment 6S

4.1.3. Ligation

4.2. Construction de plasmides modifiés en N2 de la guanine sur le fragment 6S

4.3. Essais de mutagénèse

5. Détermination de la mutation présente sur le plasmide

5.1. Marquage au ^{32}P des extrémités 3' du fragment 6S

5.2. Préparation des fragments 6S simples brins

5.2.1. Séparation des brins sur gel d'acrylamide

5.2.2. Récupération des brins marqués

5.3. Séquençage des fragments 6S

5.3.1. Réactifs et tampons

5.3.2. Réactions chimiques

a. modifications

b. précipitations-lavages

c. coupure à la pipéridine

5.3.2. Gels de séquences

I. MATERIEL

1. SOUCHES BACTERIENNES

4 souches bactériennes sont utilisées :

- AB1157 : sauvage (*thr1, leu6, proA2, his4, argE3, thi1, lacY1, galK2, ala14, xyl5, mtl1, strA31, supE44*)
- AB1886 : comme AB1157 sauf *uvrA6*
- AB1884 : comme AB1157 sauf *uvrC34*
- GW2100 : comme AB1157 sauf *umuC::Tn5*

2. MILIEUX ET TAMPONS

2.1. Milieux de culture bactérienne

- LB (Luria Broth) :

Bactotryptone	10 g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g

Ajuster à pH 7,3 avec NaOH, qsp H₂O : 1L; stériliser .

- Milieu LB solide : 20g/l Difco Bacto Agar
sélection des transformants Ap^R : ampicilline 50 µg/ml
isolement des mutants Ap^RTc^S :
Mutants Ap^RTc₂₀^S : tétracycline 20 µg/ml
Mutants Ap^RTc₂₀^RTc₄₀^S : tétracycline 40 µg/ml

2.2. Solutions et tampons usuels

<u>BB-Fi</u> :	EDTA, pH7,4	0,4 M
	Glycérol	50 %
	Bleu de bromophénol	0,1 %
	Ficoll 400	0,2 %
<u>Sevag</u> :	1 partie d'alcool isoamylique 24 parties de chloroforme	
<u>STET</u> :	Sucrose	8%
	Triton	5%
	EDTA	50mM
	Tris-HCl, pH8	50mM
<u>TAE</u> :	Tris-HCl	10mM
	Acétate de sodium	5mM
	EDTA	1mM
	Ajuster à pH8,2 par CH ₃ COOH glacial (13,6N)	

Tampon Digestion (Boehringer) :

Tris-HCl, pH7,5	50mM
-----------------	------

MgCl ₂	10mM
Dithioérythritol	1mM
NaCl	100mM

Tampon Dénaturation :

EDTA	1mM
DMSO	30%
Bleu de bromophénol	0,05%
Bleu de cyanol	0,05%

Tampon Hydrolyse :

Tris-HCl, pH7,5	5mM
MgCl ₂	2mM
CaCl ₂	2mM

Tampon Klenow :

Tris-HCl, pH7,5	70mM
MgCl ₂	10mM
DTT	5mM

Tampon Ligation (IBI) :

Tris-HCl, pH7,8	25mM
MgCl ₂	10mM
DTT	2mM
ATP	0,4mM

Tampon Renaturation :

Tris-HCl, pH7	10mM
NaCl	170mM
EDTA	1mM

<u>TBE</u> :	Tris-HCl, pH8,2	90mM
	EDTA	2,5mM
	Borate (H ₃ BO ₃)	90mM

<u>TCM</u> :	Tris-HCl, pH7	10mM
	CaCl ₂	10mM
	MgCl ₂	10mM

<u>TE</u> :	Tris-HCl, pH8	10mM
	EDTA	1mM

II. METHODES**1. TECHNIQUES USUELLES****1.1. Obtention d'ADN sec dépourvu de sels**

L'ADN en solution est précipité par addition de 3 volumes d'éthanol salin (éthanol/acétate

de sodium 0,16M), placé 15 min. à -80°C et centrifugé 20 min. à 10000 rpm (10K). Le culot est lavé deux fois à l'éthanol à 70% pour éliminer les sels, puis séché sous vide.

1.2. Déprotéinisation de l'ADN

Les protéines sont éliminées par addition d'un volume de Phénol-Sevag 1:1(v:v) et agitation pendant 2 min. Après centrifugation (5 min., 10K), la phase aqueuse est prélevée et subit deux extractions au Sevag avant précipitation et rinçage.

1.3. Minipréparation d'ADN plasmidique

- Culture des transformants Ap^R: 1,5 ml de LB-Apensemencés avec 1 clone et agités 1 nuit à 37°C
- Lyse : la culture *overnight* est centrifugée 2' à 10K. Le culot est repris dans $400\mu\text{l}$ de STET, $40\mu\text{l}$ de lysozyme (10 mg/ml) et plongé 40 sec. dans un bain-marie à 100°C . Après centrifugation (15', 10K), le culot est éliminé et l'ADN est précipité, lavé, séché. Le culot est repris dans $100\mu\text{l}$ de TE et $2\mu\text{l}$ de RNase (2mg/ml) puis incubé 30 min. à 37°C . Après déprotéinisation, l'ADN plasmidique est précipité, rincé, séché et repris dans $50\mu\text{l}$ de TE. Cette technique rapide permet de récupérer 5 à $10\mu\text{g}$ de plasmides.

1.4. Préparation d'ADN plasmidique (d'après Clewell & Helinski, 1969)

Cette technique est utilisée lorsque des quantités plus importantes de plasmides sont nécessaires et/ou que l'ADN doit être parfaitement purifié (modification chimique, marquage).

1.4.1. Culture des bactéries

La souche AB1157 contenant le plasmide désiré est amplifiée en LB-Ap à 37°C jusqu'à $\text{DO}_{700}=0,5$ (250 ml de culture). On ajoute le chloramphénicol ($100\mu\text{g}/\text{ml}$), puis 1 nuit à 37°C .

1.4.2. Lyse bactérienne

Le culot bactérien est repris dans 5ml de Tris-Sucrose puis :

- $1,25\text{ml}$ de lysozyme (10mg/ml) 10 min. à 0°C
- $2,5\text{ml}$ d'EDTA 0,5M, pH8 10 min. à 0°C
- 15ml de sarcosyl (2%) 20 min. à 0°C

Centrifugation 1h. à 45K, 5°C ; le surnageant est recueilli puis :

- RNase ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) 10 min. à 37°C
- Protéinase K ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) 1h. à 37°C

1.4.3. Précipitation de l'ADN au PEG

On ajoute - $1/9$ du volume en NaCl 5M

- $1/10$ du volume en PEG 6000 solide, 2h. à 4°C

Centrifugation 30 min. à 12K

1.4.4. Purification sur chlorure de césium

Le culot est repris par 4 ml de TE, 4g de CsCl et $0,4\text{ml}$ de bromure d'éthidium (BET) dans un tube à sceller;

Centrifugation 16h. à 50K, 20°C;

La bande correspondant à l'ADN plasmidique est récupérée à la seringue.

1.4.5. Récupération et dosage de l'ADN plasmidique

A la bande récupérée, on ajoute 2 vol. d'eau et 2 vol. d'éthanol : 3h. à -20°C;

Centrifugation 30 min. à 12K; le culot est repris dans 500µl de TE;

Déprotéinisation, précipitation, lavages, séchage.

Le culot est repris dans le TE et l'ADN est dosé par spectrophotométrie UV (260 nm) contre du TE.

Le rendement habituel est d'environ 100µg/250 ml de culture.

2. PREPARATION DU CANCEROGENE ULTIME, l'Ac-4HA[2-³H]QO

Toutes les synthèses chimiques sont réalisées à partir du précancérogène tritié 4N[2-³H]QO. Par conséquent, tous les dérivés mentionnés ci-dessous et utilisés pour ce travail sont tritiés sur le carbone 2 du noyau quinoléine :

-Le 4HAQO est obtenu par réduction du 4NQO par la technique d'Enomoto (Enomoto *et al.*, 1968);

-Le DiAc-4HAQO est préparé à partir du 4HAQO par la méthode de Kawazoe (Kawazoe & Araki, 1967);

-L'Ac-4HAQO est obtenu par action du dithiothréitol (DTT, 32ug/µl de DMSO) sur le DiAc-4HAQO (40µg/µl de DMSO). Le mélange est réalisé volume à volume et la réaction est menée à température ambiante, 15 min. à l'obscurité (Bailleul *et al.*, 1983).

3. PREMIERE STRATEGIE DE MUTAGENESE : MODIFICATION DU PLASMIDE ENTIER

Sur la forme superenroulée du plasmide natif, le cancérogène se fixe préférentiellement en N2 de la guanine. Cette stratégie sera utilisée principalement pour l'étude de l'adduit dGuo-N2-AQO.

3.1. Modification chimique du plasmide

La solution de plasmides est amenée à DO₂₆₀=10 dans le TE (0,25X), soit environ à 500ng/µl.

De façon à obtenir des plasmides portant un nombre différent d'adduits, le mélange ADN/cancérogène est fait à différents rapports R avec :

$$R = \text{DiAc-4HAQO } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) / \text{ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

Afin d'améliorer la fixation préférentielle du cancérogène en N2 de la guanine, différentes conditions de température ont été choisies : 37, 0 et -10°C pendant 15 min.

L'ADN modifié est purifié par 3 cycles de précipitation, lavages, séchage. L'ADN est alors amené à DO₂₆₀=20.

Pour chaque série de plasmides modifiés, un témoin est effectué sans cancérogène (contact avec le DMSO, précipitations, centrifugations, séchages).

3.2. Détermination du nombre d'adduits par plasmide

L'ADN modifié est dosé par spectrophotométrie UV (DO_{260}).

La concentration en cancérogène est déterminée par mesure de la radioactivité, l'activité spécifique du DiAc-4HA[2- 3H]QO étant de 8,33mCi/mMol, soit 18300 dpm/nMol; On obtient alors le pourcentage de bases modifiées par plasmide, converti ensuite en nombre d'adduits par pBR322 (8720 nucléotides).

3.3. Détermination de la proportion des différents adduits

L'ADN modifié est totalement hydrolysé avant analyse par chromatographie liquide à haute pression (CLHP) (Galiègue-Zoutina *et al.*, 1985).

3.3.1. Hydrolyse enzymatique

Enzymes :

-Solution de DNases : DNase I de pancréas bovin (100 μ g/ml)
Phosphodiesterase de venin de crotale (400 μ g/ml)
Phosphodiesterase de rate de veau (200 μ g/ml)
En solution dans le Tampon Hydrolyse.

-Phosphatase alcaline d'intestin de veau (20UI/mg) en solution dans du TE 0,5X (4UI/ml)

Environ 30 μ g d'ADN modifié sont amenés à une concentration de 2 à 3 μ g/ μ l de Tampon Hydrolyse; on ajoute :

- 1/10 du volume en DNases; 1 nuit à 37°C
- 1/10 du volume en phosphatase; 4 à 6h. à 37°C

3.3.2. Analyse des hydrolysats par CLHP

La chromatographie liquide à haute pression (CLHP) est réalisée sur chromatographe Waters ALC/GPC M45-6000A-M660 sur lequel est branchée une colonne analytique garnie en phase inverse Microbondapack C18. Dix μ l d'hydrolysats sont injectés et les composés sont élués à l'aide d'un gradient linéaire eau / méthanol-eau (95-5), effectué en 20 min. de 0 à 90% en méthanol-eau, à un débit de 2ml/min.

Le détecteur d'absorption UV (254 et 365 nm) donne directement le profil d'éluion des composés en fonction du temps (Fig.15). Le temps de rétention par la colonne de chaque composé ainsi que le rapport DO_{254}/DO_{365} permettent leur identification (Galiègue-Zoutina *et al.*, 1985). Le pourcentage relatif de chaque adduit est déterminé par le rapport des différents pics obtenus. La précision est de +-5%.

3.4. Transformation bactérienne

3.4.1. Transformation classique

La méthode utilisée est celle de Cohen (Cohen *et al.*, 1972) :

- croissance des bactéries en milieu LB à 37°C jusqu'à $DO_{700}=0,2$ (phase exponentielle de croissance). Centrifugation 10 min. à 3K.

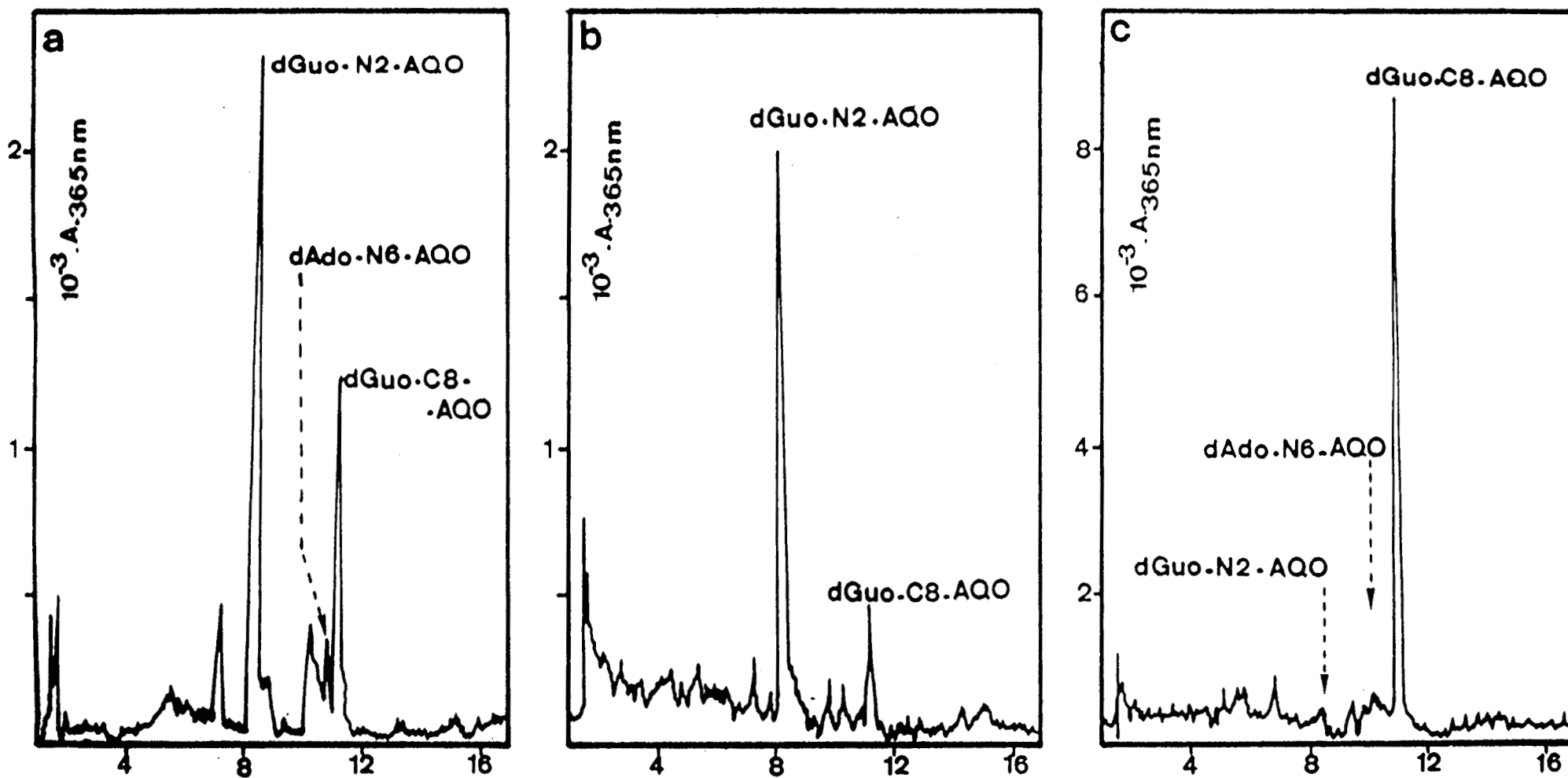


Figure 15 : Profils d'élution par CLHP de différents hydrolysats d'ADN modifiés par l'Ac-4HAQO. Etat de l'ADN modifié et température de réaction: a : pBR322 superenroulé, 37°C; b : pBR322 superenroulé, 0°C; c : ADN dénaturé, 95°C.

- concentration au 1/2 des bactéries en CaCl_2 50mM, 20 min. à 0°C
centrifugation 10 min. à 2K
- concentration au 1/10 en CaCl_2 50mM (cellules compétentes)
- l'ADN à transférer est repris dans 100 μl de TCM (0,1-1ng d'ADN par μl)
puis ajouté à 200 μl de bactéries compétentes;
- incubation 30 min. à 0°C;
- choc thermique : 3 min. à 42°C; qsp 1ml par du LB.

3.4.2. Transformation après induction du système SOS

- les bactéries à $\text{DO}_{700}=0,2$ sont mises en suspension dans le même volume de MgSO_4 10mM (transparent aux UV) et sont irradiées à l'aide d'une lampe germicide (15W). La dose appliquée est mesurée par dosimètre Latarget 103. Pour 45 J/m^2 elle correspond à une survie d'environ 30% de la souche AB1157;
- après irradiation, les cellules sont reprises dans le même volume de LB et incubées 30 min. à 37°C afin de permettre l'expression des fonctions SOS;
- la mise en compétence et la transformation sont alors faites comme précédemment.

3.5. Sélection des transformants et isolement des mutants Tc sensibles

Les cellules transformées sont sélectionnées sur boîte de Pétri LB-Ap. La numération des clones obtenus après incubation (1 nuit à 37°C) permet de calculer l'efficacité de transformation (ET, en transformants/ng de plasmide). Le rapport entre l'ET d'un plasmide modifié et celle du plasmide témoin donne l'efficacité relative de transformation (ERT) pour le nombre d'adduits déterminé sur le plasmide utilisé.

Les mutants Ap^RTc^S sont isolés par repiquage individuel des clones Ap^R sur boîte de Pétri LB-Tc₂₀ (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), LB-Tc₄₀ (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et sur LB-Ap (pour ne pas perdre le mutant Tc^S). Les clones $\text{Ap}^R\text{Tc}_{20}^S$ sont appelés mutants «forts» et les clones $\text{Ap}^R\text{Tc}_{20}^R\text{Tc}_{40}^S$ mutants «faibles», la mutation du gène Tc n'entraînant pas, dans ce cas, l'inactivation totale de la protéine codée.

Le rapport entre le nombre de mutants repérés et le nombre de transformants testés donne la fréquence de mutation (Fm, %).

Chaque plasmide muté est amplifié par minipréparation, sa taille est vérifiée sur minigel TBE-agarose (0,8%)+ BET (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

3.6. Sélection des plasmides mutés sur le fragment 6S : cartographie par délétion

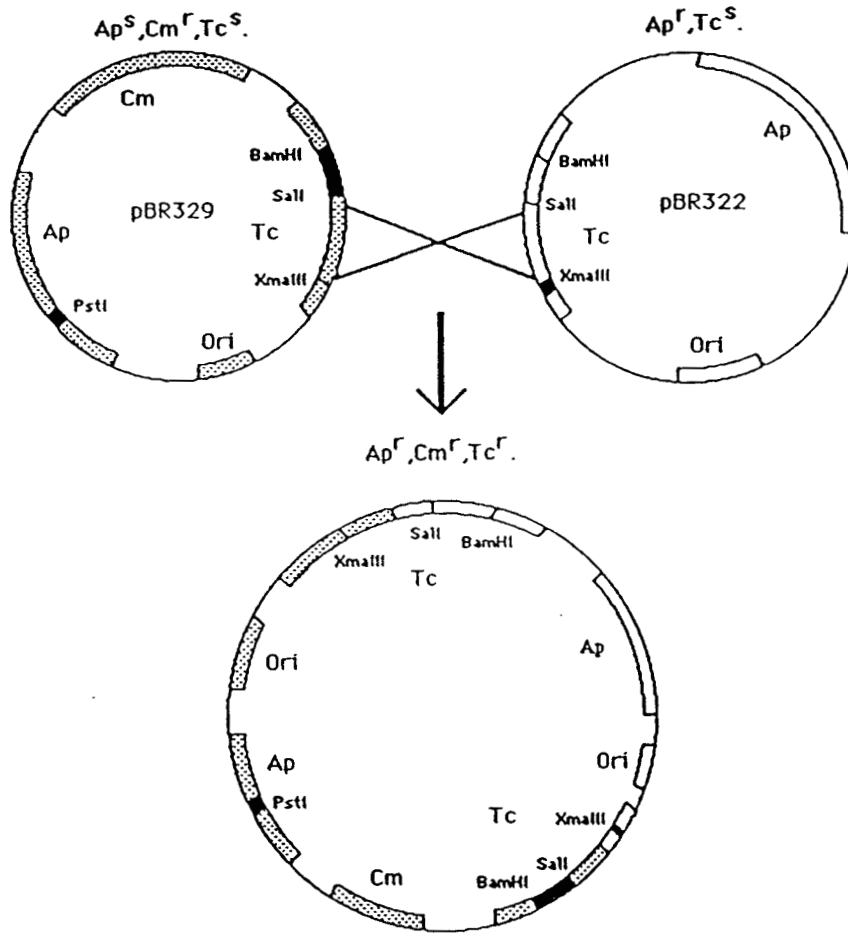
Cette technique est utilisée pour isoler les mutants Tc^S dont la mutation se trouve sur le fragment de restriction BamHI-SalI (6S); le séquençage du 6S permettra de localiser et d'identifier la mutation (Bichara & Fuchs, 1985).

3.6.1. Principe (Fig.16)

Le plasmide pBR329 dérive du pBR322 et porte les gènes codant pour la résistance aux 3 antibiotiques suivants : ampicilline (Ap), tétracycline (Tc) et chloramphénicol (Cm). Ce plasmide a été délété sur le site PstI du gène Ap; il a également subi une délétion du fragment BamHI-SalI en début de gène Tc et possède le phénotype Ap sensible, Tc sensible et Cm résistant ($\text{Ap}^S \text{Tc}^S \text{Cm}^R$).

Le principe consiste à co-transformer *E.coli* par le plasmide pBR329 ($\Delta\text{BamHI-SalI}$, ΔPstI) et par le pBR322 portant la mutation que l'on désire localiser sur le gène Tc. Dans une bactérie

Sélection des mutants du fragments 6s par cartographie par délétion



Cas de recombinaisons possibles:

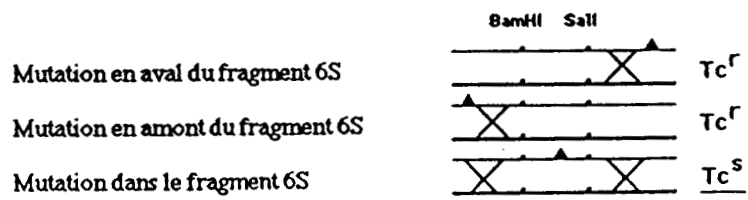


Figure 16 : Principe de sélection des plasmides mutés sur le fragment 6S par cartographie par délétion (Bichara, 1986).

en croissance, ces plasmides pourront se recombiner entre eux et nous testerons les colonies recombinantes pour la résistance à la tétracycline. S'il existe des clones recombinants de phénotype Tc^R, nous pouvons conclure que la mutation se trouve en dehors du fragment 6S; en effet, pour que la recombinaison puisse permettre de restaurer un gène intact codant pour la résistance à la Tc, il faut que le fragment 6S du plasmide pBR322 testé ne soit pas muté (Fig.16). Par conséquent, nous ne sélectionnerons que les plasmides qui, après recombinaison avec le pBR329 (Δ BamHI-Sall, Δ PstI) sont incapables de restaurer un gène Tc complet. Les bactéries portant de tels recombinants auront toujours le phénotype Tc^S.

3.6.2. Obtention de doubles transformants

La stratégie consiste à transformer la souche AB1157 contenant le plasmide pBR329 (Δ BamHI-Sall, Δ PstI) avec le pBR322 muté que l'on désire cartographier. Les plasmides des doubles transformants sont maintenus par sélection sur milieu contenant à la fois de l'ampicilline (50 μ g/ml) et du chloramphénicol (30 μ g/ml). Les cellules sont transformées avec le 1/5^{ème} des ADN obtenus par minipréparation; 60 μ l des cellules transformées sont étalées sur milieu LB-Ap (50 μ g/ml)-Cm (30 μ g/ml).

3.6.3. Test de recombinaison interplasmidique

Un clone de double transformant Ap^RCm^R de taille moyenne (O=1mm soit à peu près 3-5.10⁶ cellules) est repris dans 1ml de LB. Des dilutions en cascade permettent d'obtenir finalement entre 300 et 500 cellules par ml; 100 μ l de cette dernière dilution servent à ensemercer une préculture de 10ml de LB-Ap-Cm incubée une nuit à 37°C. Cette préculture *overnight* saturée, dans laquelle la recombinaison a eu lieu, est centrifugée (4K, 10') puis reprise dans 1ml de LB dont on étale 200 μ l sur milieu LB-Tc (20 μ g/ml).

Lors de chaque test de recombinaison, on effectue deux contrôles internes en utilisant deux témoins mutants Ap^RTc^S de pBR322 dont l'emplacement de la mutation est connu :

- un témoin Tc^S où la mutation se situe à l'extérieur du fragment 6S; ce mutant a été construit par délétion au niveau du site XmaIII (mutant XmaIII, contrôle positif);
- un témoin obtenu par mutagenèse dirigée (2nde stratégie) et où la mutation se trouve sur le fragment 6S (mutant i, contrôle négatif).

Le taux de recombinaison, défini comme le rapport du nombre de recombinants Tc^R obtenus sur le nombre total de doubles transformants, se situe expérimentalement entre 5.10⁻⁹ et 10⁻⁷.

4. SECONDE STRATEGIE DE MUTAGENESE : MODIFICATION CIBLEE SUR LE FRAGMENT 6S

4.1. Construction de plasmides modifiés en C8 de la guanine sur le fragment 6S

Cette technique permet de modifier le fragment 6S sous forme dénaturée, la réaction se fait alors à 80-90% en C8 de la guanine.

4.1.1. Séparation et récupération des fragments 16S et 6S

L'ADN est dilué entre 50 et 100 μ g/ml de Tampon Digestion puis digéré par les enzymes

BamHI et Sall (2 à 3U/ μ g d'ADN) pendant 1h. à 37°C. Après addition du tiers du volume en BB-Fi, la digestion est déposée sur gel préparatif TAE-agarose (1,2%)+BET (1 μ g/ μ l) puis mise en migration 1 nuit sous 30V.

Les bandes de 16S et de 6S sont découpées et les fragments sont récupérés par électroélution en TAE (110mA, 2-3h.). Les éluats sont précipités et les culots lavés, séchés et repris dans le TE avant dosage à 260 nm.

4.1.2. Modification chimique du fragment 6S

La solution de 6S est amenée à 500ng/ μ l de TE 0,5X puis dénaturée 5 min. à 95°C. La modification par l'Ac-4HAQO peut alors se faire :

-soit directement à 95°C, 15 min.

-soit à 37°C, 15 min., après refroidissement rapide de la solution dans la glace et réincubation à 37°C

Le rapport R choisi est de 0,1 de façon à obtenir 3 à 4 adduits par fragment 6S simple brin. Après modification, la solution d'ADN subit 2 cycles de précipitation, lavages, séchage. Le culot est repris dans le Tampon Renaturation (300ng/ μ l) et le fragment 6S est renaturé 30 min. à 55°C puis laissé à refroidir lentement sur la paillasse.

Les quantités de 6S disponibles étant relativement faibles, le dosage des adduits et l'analyse CLHP sont effectués sur une solution de fragments 16S modifiés en parallèle (mêmes concentration en ADN et rapport R).

4.1.3. Ligation

Rapport molaire 6S modifié/16S : 2

Concentration en ADN : 100ng/10 μ l de Tampon Ligation

Enzyme : 3 à 4 U. de T4 DNA Ligase (IBI) pour 100ng d'ADN

Incubation : 1 nuit à 16°C

4.2. Construction de plasmides modifiés en N2 de la guanine sur le fragment 6S

Cette technique a été utilisée de façon ponctuelle afin d'obtenir directement des mutants N2-G dont la mutation se trouve sur le fragment 6S.

- les plasmides sont modifiés en N2 comme précédemment (voir 3.1-3.3) puis digérés par BamHI et Sall (4.1.1)

- les fragments 16S et 6S sont séparés sur gradient de saccharose 5-20% dans le tampon Tris-HCl (pH8, 20mM), EDTA (20mM), NaCl (200mM) : 35K, 20°C, 15h. Le gradient est aliquoté en fractions de 650 μ l; les fragments sont repérés sur gel d'agarose 8%+BET puis précipités, lavés, séchés.

- la ligation est effectuée comme précédemment (4.1.3.)

4.3. Essais de mutagenèse

Les 10 μ l de ligation sont complétés à 100 μ l par du TCM.

La transformation est faite après induction des fonctions SOS de la bactérie (voir 3.4.2.). Sélection des transformants et repérage des mutants forts et faibles sont effectués comme précédemment (voir 3.5.).

La transformation bactérienne par un mélange de ligation pouvant provoquer des «aberrations plasmidiques» (dimérisation de fragments 16S, recombinaison), chaque plasmide de mutant Tc^S isolé est amplifié avant minipréparation. La taille du plasmide est

vérifiée et sur chaque ADN de 4,3Kb, la présence des sites BamHI et Sall est contrôlée par digestion et migration sur minigel.

Les plasmides répondant à ces conditions portent obligatoirement leur mutation sur le fragment 6S et sont directement séquençables.

5. DETERMINATION DE LA MUTATION PORTEE PAR LE PLASMIDE

5.1. Marquage au ^{32}P des extrémités 3' du fragment 6S

Nous utilisons la technique de *Gap-Filling* («rebouchage de trou») par l'enzyme Klenow d'*E.coli* :

- 20 μl d'ADN sont digérés par 50U. de BamHI et 50U. de Sall dans le Tampon Digestion (100 μg d'ADN/ml) pendant 1h. à 37°C puis précipités, lavés, séchés.

- le culot est repris dans le Tampon Klenow (98 μl) en présence de dATP, dGTP, dCTP (1,2mM) et de 160 μCi de dTTP- $\alpha^{32}\text{P}$ (Activité Spécifique : 3000Ci/mmol, concentration 1mCi/ml).

- on ajoute 2U. d'enzyme Klenow (Boehringer, *labelling grade*) avant d'incuber la réaction 25 min. à température ambiante.

- l'ADN est alors précipité, lavé, séché.

5.2. Préparation des fragments 6S simples brins

5.2.1. Séparation des brins sur gel d'acrylamide

Le culot est repris dans 50 μl de Tampon Dénaturation; l'ADN est alors dénaturé 2 min. à 90°C, refroidi rapidement dans la glace et chargé sur gel d'acrylamide.

Gel d'acrylamide :

- Acrylamide	7,84% (w/v)
- N-N'méthylène bisacrylamide	0,16% (w/v)
- Tetraméthylène éthylène-diamine	0,05% (v/v)
- TBE 0,5X	
- Persulfate d'ammonium (10%, w/v)	1% (v/v)
Migration 350V, 1 nuit; Tampon de migration : TBE 0,5X	

5.2.2. Récupération des brins marqués

Le gel est autoradiographié 20 à 30 min. suivant le marquage.

Par superposition du film, les 2 bandes de 6S simples brins sont repérées et découpées. Les brins marqués sont alors électroélusés en TBE 0,5X à 4°C (110mA, 3h.) puis précipités, lavés, séchés et repris dans 32 μl d'eau.

5.3. Séquençage des fragments 6S (d'après Maxam & Gilbert, 1977)

5.3.1. Réactifs et tampons

ADN entraîneur (1mg/ml) soniqué, dans l'eau

Formiate de pipéridine 4% v/v d'acide formique, ajusté à pH2 par la pipéridine

<u>Tampon DMS</u> :	Cacodylate de sodium	50mM, pH8
	EDTA	1mM
<u>DMS Stop</u> :	Acétate de sodium	1,5M, pH7
	b-mercaptoéthanol	1M
	t-RNA	100µg/ml
<u>Hydrazine Stop</u> :	Acétate de sodium	0,3M
	EDTA	0,1M
	t-RNA	25µg/ml
	NaCl	5M
<u>Tampon de charge</u> :	Formamide désionisée	80%
	NaOH 10mM	20%
	EDTA	1mM
	Bleu de bromophénol	0,1%
	Bleu de cyanol	0,1%

5.3.2. Réactions chimiques

a. modifications

-A+G :	ADN ³² P	10µl (50-100cpm)	
	H ₂ O	10µl	
	ADN entraîneur	1µl	- 0°C -

+2µl de Formiate de pipéridine; 37°C pendant 25 min.

On congèle, lyophilise, ajoute 30µl d'eau que l'on congèle et lyophilise à nouveau, puis on coupe à la pipéridine (voir *c.*)

-G :	ADN ³² P	5µl	
	Tampon DMS	200µl	
	ADN entraîneur	1µl	- 0°C -

+1µl de DMS; 20°C pendant 3,5 min.

+50µl de DMS Stop puis précipitation-lavage (voir *b.*)

-C+T :	ADN ³² P	10µl	
	H ₂ O	10µl	
	ADN entraîneur	1µl	- 0°C -

+30µl d'hydrazine; 20°C pendant 7,5 min.

+200µl d'Hydrazine Stop (0°C) puis précipitation-lavage (voir *b.*)

-C :	ADN ³² P	5µl	
	NaCl 5M	15µl	
	ADN entraîneur	1µl	- 0°C -

+30µl d'hydrazine; 20°C pendant 7,5 min.

+200µl d'Hydrazine Stop (0°C) puis précipitation-lavage (voir *b.*)

b. précipitation-lavage (G, C+T, C)

+750 μ l d'éthanol (0°C), 10 min. à -80°C;
 Centrifugation 20 min. à 10K, 4°C;
 3 lavages à l'éthanol à 70%, séchage.

c. coupure à la pipéridine (A+G, G, C+T, C)

On ajoute 100 μ l de pipéridine 1M; 90°C pendant 30 min.
 Lyophilisation, +100 μ l d'eau et lyophilisation, +50 μ l d'eau et lyophilisation.
 Chaque culot est compté en Cerenkov et repris dans le tampon de charge de façon à avoir environ 20000cpm/ μ l.
 Après dénaturation 2 min. à 90°C et refroidissement rapide dans la glace, 2 μ l de chaque réaction sont déposés sur gel de séquence.

5.3.2. gels de séquence

<u>Gel 8% :</u>	-Acrylamide	7,6% (w/v)
	-N-N'méthylène bisacrylamide	0,4% (w/v)
	-Urée	50% (w/v)
	-TEMED	0,06% (v/v)
	-TBE 1X	
	-Persulfate d'ammonium (10%, w/v)	0,3% (v/v)

Prémigration 2h., 40W - Tampon de migration : TBE 1X
 Migration : 40W puis 20 min. dans l'acide acétique (10%) afin d'éliminer l'urée; séchage; autoradiographie : 1 nuit avec écran.

<u>Gel 25% :</u>	-Acrylamide	23,75% (w/v)
	-N-N' méthylène bisacrylamide	1,25% (w/v)
	-Urée	50% (w/v)
	-TEMED	0,04% (v/v)
	-TBE 1X	
	-Persulfate d'ammonium (10%, w/v)	0,3% (v/v)

Prémigration : 1 nuit, 600V - Tampon de migration : TBE 1X
 Migration : 40W; autoradiographie à -20°C, 3-5 jours.

APPENDICE II

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, P.J. & Shaffhill, R. (1979). DNA synthesis with synthetic poly(dG-dC) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O⁶-methylguanine. *Biochim. Biophys. Acta.*, **562**, 51-61.
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N. & Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant *c-K-ras* genes. *Cell*, **53**, 549-554.
- Ames, B.N., Gurney, E.G., Miller, J.A. & Bartsch, H. (1972). Carcinogens as frameshift mutagens : metabolites and derivatives of 2-acetoxylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. *Carcinogenesis*, **69**, 3128-3132.
- Ames, B.N., Lee, F.D. & Durston, W.E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and the classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 782-786.
- Ames, B.N., McCann, J. & Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, **31**, 347-364.
- Andres, A-C., Schöenberger, C-A., Groner, B., Hennigausen, L., LeMeur, M. & Gerlinger, P. (1987). *Ha-ras* oncogene expression directed by a milk protein gene promoter : tissue specificity, hormonal regulation, and tumor induction in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1299-1303.
- Backendorf, C.M., Van den Berg, E.A., Brandsma, J.A., Kartasova, T., Van Sluis, C. & Van den Putte, P. (1983). *In vivo* regulation of the *uvr* and *ssb* genes in *E.coli*. *Cellular Response to DNA Damage*, p.161. Alan R. Liss, New-York.
- Bagg, A. Kenyon, C.J. & Walker, G.C. (1981). Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5749-5753.
- Bailleul, B., Brown, K., Ramsden, M., Akhurst, R.J., Fee, F. & Balmain, A. (1988). Chemical induction of oncogene mutations and growth factor activity in mouse skin carcinogenesis. *Environmental health perspective (ed. A.Upton)*.
- Bailleul, B., Daubersies, P., Galiègue-Zouitina, S. & Loucheux-Lefebvre, M-H. (1989). Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis. *Jap. J. Cancer Res. (Gann)*, sous presse.
- Bailleul, B., Galiègue-Zouitina, S. & Loucheux-Lefebvre, M-H. (1981). Adducts from the reaction of O,O'-diacetyl or O-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with purine nucleosides. *Cancer Res.*, **41**, 4559-4565.
- Bailleul, B., Galiègue-Zouitina, S. & Loucheux-Lefebvre, M-H. (1984). Conformations of poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by the O-acetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Nucl. Acids Res.*, **12**, 7915-7927.
- Bailleul, B., Galiègue-Zouitina, S., Perly, B. & Loucheux-Lefebvre, M-H. (1985). Structural identification of the purine ring-opened form of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide. *Carcinogenesis*, **6** (2), 319-322.
- Balmain, A. & Pragnell, I.B. (1983). Mouse skin carcinoma induced *in vivo* by chemical carcinogens have a transforming *Harvey-ras* oncogene. *Nature*, **303**, 72-74.

- Balmain, A., Ramsden, A., Boxden, G.D. & Smith, J. (1984). Activation of the mouse cellular *Harvey-ras* in chemically induced benign skin papillomas. *Nature*, **307**, 658-660.
- Barbacid, M. (1986). Oncogenes and human cancer : cause or consequence? *Carcinogenesis*, **7**, 1037-1042.
- Barbacid, M. (1987). *Ras* genes. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 779-872.
- Benzer, S. (1961). On the topography of the genetic fine structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 403-415.
- Berg, J.M. (1986). Potential metal-binding domains in nucleic acid binding protein. *Science*, **232**, 485-487.
- Berger, C.A. & Edenberg, H.J. (1986). Pyrimidine dimers block simian virus 40 replication forks. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3443-3450.
- Bichara M. & Fuchs R. (1985). DNA binding and mutation spectra of the carcinogen N-2-aminofluorene in *Escherichia coli*. A correlation between the conformation of the premutagenic lesion and the mutation specificity. *J. Mol. Biol*, **183**, 341-351.
- Bishop, J. M. (1983). Cancer gene come of age. *Cell*, **32**, 1018-1020.
- Blanco, M., Herrera, G., Collado, P., Rebollo, J., & Botella, L.M. (1982). Influence of the RecA protein on induced mutagenesis. *Biochimie*, **64**, 633-636.
- Bos, J.L., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Verlaan-de Vries, M., Van Boom, J.H., Van Der Eb, A.J. & Vogelstein, B. (1987-a). Prevalence of *ras* gene mutation in human colorectal cancers. *Nature*, **327**, 293-297.
- Bos, J.L., Toksoz, D., Marshall, C.J., Verlaan-de Vries, M., Veeneman, G.H., Van Der Eb, A.J., Van Boom, J.H., Janseen, J.W.G. & Steenvoorden, A.C.M. (1985). Amino acid substitutions at codon 13 of the *N-ras* oncogene in human acute myeloid leukemia. *Nature*, **315**, 726-730.
- Bos, J.L., Verlaan-de Vries, M., Van Der Eb, A., Janssen, J.W.G., Delwel, R., Löwenberg, B. & Colly, L.P. (1987-b). Mutation in *N-ras* predominate in acute myeloid leukemia. *Blood*, **69**, 1237-1241.
- Bourguignon-Van Houren, F., Brotcom, A., Caillet-Fauquet, P., Diver, W.P., Dohet, C., Doubleday, O., Lecomte, P., Maenhaut-Michel, G. & Radman, M. (1982). Conversion and diversification of genes by mismatch correction and SOS induction. *Biochimie*, **64**, 559-564.
- Braedt, G. & Smith, G.R. (1989). Strand specificity of DNA unwinding by RecBCD enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 871-875.
- Bridges, B.A. & Woodgate, R. (1984). Mutagenic repair in *E.coli*. The *umuC* gene product may be required for replication past pyrimidine dimers but not for the coding error in UV-mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.*, **196**, 364-366.
- Bridges, B.A. & Woodgate, R. (1985). Mutagenic repair in *E.coli* : product of the *recA* gene and of the *umuD* and *umuC* genes act at different steps in UV-induced mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4193-4197.
- Burckhardt, S.E., Woodgate, R., Scheurmann, R.H. & Echols H. (1988). UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli* : Overproduction, purification and cleavage by RecA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1811-1815.

Burnouf, D., Daune, M. & Fuchs, R.P.P. (1987). Spectrum of cisplatin-induced mutations in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3758-3752.

Burnouf, D. Koehl, P. & Fuchs R.P.P. (1989). Single adduct mutagenesis : strong effect of the position of a single acetylaminofluorene adduct within a mutation hot spot. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, sous presse.

Burns, P.A., Allen, F.L. & Glickman, B.W. (1986). DNA sequence analysis of mutagenicity and site specificity of ethyl methanesulfonate in *uvr*⁺ and *uvr*⁻ strains of *E.coli*. *Genetics*, **113**, 811-819.

Burns, P.A., Gordon, A.J.E. & Glickman, B.W. (1987). Influence of neighbouring base sequence on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine mutagenesis in the *lacI* gene of *E.coli*. *J. Mol. Biol.*, **194**, 385-390.

Burns, P.A., Gordon, A.J.E. & Glickman, B.W. (1988). Mutational specificity of N-methyl-N-nitrosourea in the *lacI* gene of *E.coli*. *Carcinogenesis*, **9**, 1607-1610.

Caron, P.C., Kushner, S.R. & Grossman, L. (1985). Involvement of Helicase II (*uvrD* gene product) and DNA Polymerase I in excision mediated by the *uvrABC* protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4925-4929.

Cleaver, J.E. (1968). Defective repair replication of DNA in *Xeroderma pigmentosum*. *Nature*, **218**, 652-656.

Clewell, D.B. & Helinski, D.R. (1969). Supercoiled circular DNA-protein complex in *E.coli* : purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **62**, 1159-1166.

Cohen, S.N., Chang, A.C. & Hsu, L. (1972). Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria : Genetic transformation of *E.coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2110-2114.

Conley, E.C. & West, S.C. (1989). Homologous pairing and the formation of nascent synaptic intermediates between regions of duplex DNA by RecA protein. *Cell*, **56**, 987-995.

Cooper, G. M. (1982). Cellular transforming genes. *Science*, **218**, 801-806.

Coulondre, C. & Miller, J.H. (1977-a). Genetic studies of the *lac* repressor. III : additional correlation of mutational sites with specific amino acid residues. *J. Mol. Biol.*, **109**, 525-575.

Coulondre, C. & Miller, J.H. (1977-b). Genetic studies of the *lac* repressor. IV : mutagenic specificity in the *lac I* gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **109**, 577-606.

Cox, M.M. (1987). Enzymes of general recombination. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 229-262.

Cox, M.M. & Lehman, I. R. (1982). RecA protein-promoted DNA strand exchange. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8523.

Craig, L.N. & Roberts, J.W. (1980). *E.coli* RecA protein directed cleavage of the phage λ repressor requires polynucleotides. *Nature*, **283**, 26-30.

Craig, L.N. & Roberts, J.W. (1981). Function of nucleoside triphosphate and polynucleotide in *Escherichia coli* RecA-directed cleavage of the λ repressor. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8039-8044.

- D'Ari, R. (1985). The SOS system. *Biochimie*, **67**, 343-347.
- De Flora, S., Bennicelli, C., Camoirano, A., Serra, D. & Hochstein, P. (1988). Influence of DT Diaphorase on the mutagenicity of organic and inorganic compounds. *Carcinogenesis*, **9**, 611-617.
- Demeunynck, M., Tohmé, M., Lhomme, M-F., Mellor, J.M. & Lhomme, J. (1986). Concerning of the mode of reaction of the proposed ultimate metabolite of the carcinogen 4NQO. Evidence for intermediacy of nitrenium ions. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 3539-3541.
- Drinkwater, N.R., Miller, E.C. & Miller, J.A. (1980). Estimation of apurinic/apyrimidic sites and phosphotriesters in DNA treated with electrophilic carcinogens and mutagens. *Biochemistry*, **19**, 5087-5092.
- Edwards, S., Fielding, S. & Waters, R. (1987). The response to DNA damage induced by 4-nitroquinoline-1-oxide or its 3-methyl derivative in *Xeroderma pigmentosum* fibroblasts belonging to different complementation groups : evidence for different epistasis groups involved in the repair of large adducts in human DNA. *Carcinogenesis*, **8**, 1071-1075.
- Endo, H, Ono, T. & Sugimura, T. Ed. (1971) Chemistry and biological action of 4NQO. *Recent Results in Cancer Research*, 1-103. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New-York.
- Enis, D.G., Fisher, B., Edmiston, S. & Mount, D.W. (1985). Dual role for *Escherichia coli* RecA protein in SOS mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3325-3329.
- Enomoto, M., Sato, K., Miller, E.C. & Miller, J.A. (1968). Reactivity of the diacetyl derivative of the carcinogen 4HAQO with DNA, RNA and other nucleophiles. *Life Science*, **7**, 1025-1032.
- Evans, F.E., Miller, D.W. & Beland, F.A. (1980). Sensitivity of the conformation of deoxyguanosine to binding at the C8 position by N-acetylated and unacetylated 2-aminofluorene. *Carcinogenesis*, **1**, 955-959.
- Evenson, G. & Seeberg E. (1982). Adaptation to alkylating resistance involves the induction of a DNA glycosylase activity. *Nature*, **296**, 773-775.
- Farabaugh, P.J. (1978). Sequence of the *lacI* gene. *Nature*, **274**, 765-769.
- Farr, C.J., Saiki, R.K., Erlich, H.A., Mc Cormick, F. & Marshall, C. (1988). Analysis of *RAS* gene mutation in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1629-1633.
- Fasano, O., Aldrich, T., Tamanoi, F., Taparowsky, E., Furth, M. & Wigler, M. (1984). Analysis of the transforming potential of the human *H-ras* gene by random mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4008-4012.
- Fersht, A.R. & Knill-Jones, J.W. (1983). Contribution of 3'->5' exonuclease activity of DNA Polymerase III holoenzyme from *E.coli* to specificity. *J. Mol. Biol.*, **165**, 669-682.
- Fogliano, M. & Schendel, P.F. (1981). Evidence for the inducibility of the *uvrB* operon. *Nature*, **289**, 196-198.
- Franklin, W.A. & Haseltine, W.A. (1984). Removal of UV light induced pyrimidine-pyrimidone (6-4) products from *Escherichia coli* DNA requires the *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3821-3824.

- French, S. & Robson, B. (1983). What is a conservative substitution? *J. Mol. Evol.*, **19**, 171-175.
- Friedberg, E.C. Ed. (1985) DNA Repair. Freeman and Company, San Fransisco.
- Fuchs, R.P.P. (1975). *In vitro* recognition of carcinogen-induced local denaturation sites in native DNA by S1 Endonuclease from *Aspergillus oryzae*. *Nature*, **275**, 151-152.
- Fuchs, R.P.P. (1978). Arylamidation and arylation by the carcinogen N-2-fluorenyl-acetamide : a sensitive and rapid radiochemical assay. *Anal. Biochem.*, **91**, 663-673.
- Fuchs, R.P.P., Lefèvre, J.F., Pouyet, J. & Daune, M.P. (1976). Comparative orientation of the fluorene residue in native DNA modified by N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene and two 7-halogeno derivatives. *Biochemistry*, **15**, 3347-3351.
- Fuchs, R.P.P., Schwartz, N. & Daune, M. (1981). Hot spots of frameshift mutations induced by the ultimate carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene. *Nature*, **294**, 657-659.
- Fuchs, R.P.P. & Seeberg, E. (1984). pBR322 plasmid DNA modified by 2-acetylaminofluorene derivatives : transforming activity and *in vitro* strand cleavage by the *Escherichia coli* UvrABC endonuclease. *EMBO J.*, **3**, 757-760.
- Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B., Ginot, Y-M., Perly, B. & Loucheux-Lefebvre, M-H. (1986). N²-guanyl and N⁶-adenyl arylation of chicken erythrocytes DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Res.*, **46**, 1858-1863.
- Galiègue, S., Bailleul, B. & Loucheux-Lefebvre, M-H. (1982). *In vitro* enzymatic recognition of DNA modified by O,O'-diacetyl or O-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Carcinogenesis*, **3**, 435-438.
- Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. & Loucheux-Lefebvre, M-H. (1983). *In vitro* DNA reaction with an ultimate carcinogen model of 4-nitroquinoline 1-oxide : the 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide. Enzymatic degradation of the modified DNA. *Carcinogenesis*, **4**, 249-254.
- Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. & Loucheux-Lefebvre, M-H. (1984). Guanyl-C⁸-arylation of DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide : a spectrophotometric titration. *Anal. Biochem.*, **138**, 454-457.
- Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. & Loucheux-Lefebvre, M-H. (1985). Adduct from *in vivo* action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rats and from *in vitro* reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides. *Cancer Res.*, **45**, 520-525.
- Ganesan, A.K. & Hanawalt, P.C. (1985). Effect of a *LexA41(Ts)* mutation on DNA repair in *recA(Def)* derivatives of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.*, **201**, 387-392.
- Glickman, B.W., Horsfall, M.J., Gordon, A.J.E. & Burns, P.A. (1987). Nearest neighbor affects G:C to A:T transitions induced by alkylating agents. *Environmental Health Perspectives*, **76**, 29-32.
- Glickman, B.W., Van den Elsen, P. & Radman, M. (1978). Induced mutagenesis in *dam*-mutants of *Escherichia coli* : a role for 6-methyladenine residues in mutation avoidance. *Mol. Gen. Genet.*, **163**, 307-312.

- Hanawalt, P.C., Cooper, P.K., Ganesan, A.K. & Smith, C.A. (1979). DNA repair in bacteria and mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 783-836.
- Hanawalt, P.C. & Sarasin, A. (1986). Cancer-prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. *TIG*, **2**, 124-129.
- Hebert, E., Diancourt, F., Saint-Ruf, G. & Leng, M. (1988). Mutation spectrum of the mutagen 3-N,N-acetoxyacetyl-amino-4,6-dimethyldipyrido[1,2- α :3',2'- d]imidazole in *Escherichia coli*. *Carcinogenesis*, **9**, 183-185.
- Horowitz, J.M. (1989). Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science*, **243**, 937-940.
- Howard-Flanders, P.H., Boyce, R.P & Theriot L. (1965). Three loci in *Escherichia coli* K-12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA. *Genetics*, **5**, 1119-1186.
- Howard-Flanders, P.H., West, S.C. & Stasiak, A. (1984). Role of RecA protein filament in genetic recombination. *Nature*, **309**, 215-220.
- Husain, I., Van Houten, B., Thomas, D.C., Abdel-Monem, M. & Sancar, A. (1985). Effect of DNA Polymerase I and DNA Helicase II on the turnover rate of UvrABC excision nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6774-6778.
- Ikenaga, M., Ichikawa-Ryo, H. & Kondo, S. (1975). The major cause of inactivation and mutation by 4NQO in *E.coli* : excisable 4NQO-adducts. *J. Mol. Biol.*, **92**, 341-356
- Irving, C.C. (1973). Interaction of chemical carcinogens with DNA. *Methods Cancer Res.*, **7**, 190-244.
- Ishii, Y. & Kondo, S. (1975). Comparative analysis of deletion and base-change mutabilities in *E.coli* B strains differing in DNA repair capacity (wild-type, *uvrA*⁻, *polA*⁻, *recA*⁻) by various mutagens. *Mutat. Res.*, **27**, 27-44.
- Ishizawa, M. & Endo, H. (1971). Mutagenesis of bacteriophage T4 by a carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. *Mutation Res.*, **12**, 1-8.
- Isono, K. & Yourno, J. (1974). Chemical carcinogens as frameshift mutagens : salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1612-1617.
- Ivanovic, V. & Weinstein, I.B. (1980). Genetic factors in *E.coli* that affect cell killing and mutagenesis induced by benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-oxide. *Cancer Res.*, **40**, 3508-3511.
- Jacobs, A., Bopp, A. & Hagen, U. (1972). *In vitro* repair of single-stranded breaks in γ -irradiated DNA by polynucleotide kinase. *Int. J. Radiat. Biol.*, **22**, 431.
- Johnson, J.L., Hamm-Alvarez, S., Payne, G., Sancar, G.B., Rajagopalan, K.V. & Sancar, A. (1988). Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2046-2054.
- Jones, M., Wagner, R. & Radman, M. (1987). Mismatch repair and recombination in *E.coli*. *Cell*, **50**, 621-626.

- Kacinsky, B.M. & Rupp, W.D. (1983). *E.coli* UvrB protein binds to DNA in the presence of UvrA protein. *Nature*, **294**, 480-481.
- Karran, P., Hjelmgren T. & Lindhal, T. (1982). Induction of a glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptative response to alkylating agents. *Nature*, **296**, 770-773.
- Kato, T. & Shinoura, Y. (1977). Isolation and characterisation of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutation by ultraviolet light. *Mol. Gen. Genet.*, **156**, 121-131.
- Kawazoe, Y. & Araki, M. (1967). Studies on chemical carcinogens. V. O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Gann*, **58**, 485-487.
- King, H.W.S., Osborn, M.R. & Brookes, P. (1979). The *in vitro* and *in vivo* reaction at the N7-position of guanine of the ultimate carcinogen derived from benzo(a)pyrene. *Chem. Biol. Interact.*, **24**, 345-353.
- Koffel-Schwartz, N. & Fuchs, R.P.P. (1989). Genetic control of AAF-induced mutagenesis at alternating GC sequences : an additional role for RecA. *Mol. Gen. Genet.*, **215**, 306-311.
- Koffel-Schwartz, N., Verdier, J-M., Bichara, M., Freund, A-M., Daune, M. & Fuchs, R.P.P. (1984). Carcinogen-induced mutation spectrum in wild-type, *uvrA* and *umuC* strains of *Escherichia coli*. Strain specificity and mutation-prone sequences. *J. Mol. Biol.*, **177**, 35-51.
- Kohalmi, S.E. & Kunz, B.A. (1988). Role of neighbouring bases and assessment of strand specificity in ethylmethanesulphonate and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine mutagenesis in the *SUP4-o* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.*, **202**, 561-568.
- Kohda, K., Tada, M., Hakura, A., Kasai, H. & Kawazoe, Y. (1987). Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA treated with 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide and its related compounds in the presence of seryl-AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 1141-1148.
- Kondo, S., Ichikawa, H., Iwo, K. & Kato, T. (1970). Base-change mutagenesis and prophage induction in strains of *E.coli* with different repair capacities. *Genetics*, **66**, 187-217.
- Kriek, E. (1972). Persistent binding of a new reaction product of the carcinogen N-hydroxy-N-2-acetylaminofluorene with guanine in rat liver DNA *in vivo*. *Cancer Res.*, **32**, 2042-2048.
- Kumura, K., Sekiguchi, M., Steinum, A.L. & Seeberg, E. (1985). Stimulation of the UvrABC enzyme-catalysed repair reactions by the UvrD protein (Helicase II). *Nucl. Acids Res.*, **13**, 1483-1492.
- Kunkel, T.A. (1984). Mutational specificity of depurination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1494-1498.
- Kunkel, T.A. & Bebenek, K. (1988). Recent studies of the fidelity of DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Acta*, **951**, 1-15.
- Kunkel, T.A., Schaaper, R.M., Beckman, R.A. & Loeb, L.A. (1981). On the fidelity of DNA replication. Effect of the nucleotide sequence on proofreading. *J. Biol. Chem.*, **256**, 9883-9889.
- Laspia, M.F. & Wallace, S.S. (1988). Excision repair of thymine glycols, urea residues and apurinic sites in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3359-3366.

Leng, M., Ptack, M. & Rio, P. (1980). Conformation of acetylaminofluorene and aminofluorene modified guanosine and guanosine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **96**, 1095-1102.

Lindahl, T. (1979). DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base-excision repair. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, **22**, 135-192.

Little, J.W. (1984). Autodigestion of LexA and phage λ repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1375-1379.

Little, J.W., Edmiston, S.H., Pacelli, L.Z. & Mount, D.W. (1980). Cleavage of the *Escherichia coli* LexA protein by the RecA protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3225-3229.

Little, J.W. & Mount, D.W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, **29**, 11-22.

Lloyd, R.G., Porton, M.C. & Buckman, C. (1988). Effect of *recF*, *recN*, *recO* and *ruv* mutations on ultraviolet survival and genetic recombination in a *recD* strain of *E.coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **212**, 317-324.

Loeb, L.A. (1985). Apurinic sites as mutagenic intermediates. *Cell*, **40**, 483-484.

Loechler, E.L., Green, C.L. & Essigmann, J.M. (1984). *In vivo* mutagenesis by O⁶-methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6271-6275.

Lotlikar, P.D. & Hong, Y.S. (1985). Microsomal N- and C-oxidations of carcinogenic aromatic amines and amides. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **58**, 101-107.

Lu, C., Scheuermann, R.H. & Echols H. (1986). Capacity of RecA protein to bind preferentially to UV lesions and inhibit the editing subunit (ϵ) of DNA Polymerase III : a possible mechanism for SOS-induced targeted mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 619-623.

Mac Cann, J., Choi, E., Yamasaki, E. & Ames, B.N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens : bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135-5139.

Mac Coy, E.C., Petrullo, L.A., Rosenkranz, H.S. & Mermelstein, R. (1981). 4-nitroquinoline 1-oxide : factors determining its mutagenicity in bacteria. *Mutation Res.*, **89**, 151-159.

Madijaru, M.V.V.S., Templin, A. & Clark, A.J. (1988). Properties of a mutant *recA*-encoded protein reveal a possible role for *E.coli recF*-encoded protein in genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6592-6596.

Marsh, M. & Walker, G.C. (1985). Cold sensitivity induced by overproduction of UmuDC in *E.coli*. *J. Bacteriol.*, **162**, 155-161.

Marshall, C.J., Vousden, K.H. & Phillips, D.H. (1984). Activation of *c-Ha-ras-1* proto-oncogene by *in vitro* modification with a chemical carcinogen, benzo(a)pyrene diol-epoxide. *Nature*, **310**, 586-589.

Matson, S.W. (1986). *Escherichia coli* Helicase II (*uvrD* gene product) translocates unidirectionally in a 3' to 5' direction. *J. Biol. Chem*, **261**, 10169-10175.

Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1977). A new method for DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 560-564.

- Menichini, P., Fronza, G., Tornaletti, S., Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B., Loucheux-Lefebvre, M-H., Abbondandolo, A. & Pedrini, A.M. (1989). 4-nitroquinoline 1-oxide : influence of superhelicity. *Carcinogenesis*, accepted.
- Miller E.C. (1978). Some current perspectives on chemical carcinogens in human and experimental animals : presidential address. *Cancer Res.*, **38**, 1479-1496.
- Miller, J.A. (1970). Carcinogenesis by chemicals : an overview. *Cancer Res.*, **30**, 559-576.
- Miller, J.A. & Miller, E.C. (1979). Perspectives on the metabolism of chemical carcinogens. Environmental carcinogenesis, (Emmelot, P. & Kriek, E., eds), 25-50. Elsevier/North Holland Biomedical Press.
- Miller, J.H., Coulondre, C. & Farabaugh, P.J. (1978). Correlation of nonsense sites in the *lacI* gene with specific codons in the nucleotide sequence. *Nature*, **274**, 770-775.
- Mirzayans, R., Paterson, M.C. & Waters, R. (1985). Defective repair of a class of 4NQO-induced alkali-labile DNA lesions in *Xeroderma pigmentosum* complementation group A fibroblasts. *Carcinogenesis*, **6**, 555-559.
- Mirzayans, R., Sabour, M. & Paterson M.C. (1988). Enhanced bioreduction of 4-nitroquinoline 1-oxide by cultured *Ataxiatelangiectasia* cells. *Carcinogenesis*, **9**, 1711-1715.
- Mirzayans, R. & Waters, R. (1981). DNA damage and its repair in human normal or *Xeroderma pigmentosum* fibroblasts treated with 4-nitroquinoline 1-oxide or its 3-methyl derivative. *Carcinogenesis*, **2**, 1359-1362.
- Moore, P.D., Bose, K.K., Rabkin, S.D. & Strauss, B.S. (1981). Sites of determination of *in vitro* DNA synthesis on ultraviolet- and N-acetylaminofluorene-treated Φ X174 templates by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 110-114.
- Moreau, P.L. (1985). Role of *E.coli* RecA protein in SOS induction and post-replication repair. *Biochimie*, **67**, 353-356.
- Nakahara, W., Fukuoka, F. & Sugimura, T. (1957). Carcinogenic action of 4NQO. *Gann*, **48**, 129-137.
- Neri, A., Knowles, D.M., Greco, A., Mc Cormick, F. & Dalla-Favera, R. (1988). Analysis of *RAS* oncogene mutations in human lymphoid malignencies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9268-9272.
- Nishida, J., Hirai, H. & Takaku, F. (1987-a). Activation of the *N-ras* oncogene in human leukemias detected by synthetic oligonucleotide probes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **147**, 870-875.
- Nishida, J., Kobayashi, Y., Hirai, H. & Takaku, F. (1987-b). A point mutation at codon 13 of the *N-ras* oncogene in a human stomach cancer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **146**, 247-252.
- Nohmi, T., Battista, J.R., Dodson, L.A. & Walker, G.C. (1988). RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis : mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1816-1820.
- Oeda, K., Horiuchi, T. & Sekiguchi, M. (1981). Molecular cloning of the *uvrD* gene of *E.coli* that control ultraviolet sensitivity and spontaneous mutation frequency. *Mol. Gen. Genet.*, **184**, 191.

- Oh, E.Y. & Grossman, L. (1986). The effect of *E.coli* Uvr protein binding on the topology of supercoiled DNA. *Nucl. Acids Res.*, **14**, 8557-8571.
- Oh, E.Y. & Grossman, L. (1987). Helicase properties of the *Escherichia coli* UvrAB protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 3638-3642.
- Panigrahi, G.B. & Walker, I.G. (1989). The N2-guanyl 4NQO adduct but not the C8-guanyl or N6-adenyl 4NQO adducts block the 3'→5' exonuclease activity of T4 DNA Polymerase. *Nucl. Acids Res.*
- Paterson, M.C., Smith, P.J., Bech-Hansen, N.T., Smith, B.P. & Sell, B.M. (1979). γ -ray hypersensitivity and faulty DNA repair in cultured cells from humans exhibiting familial cancer proneness. In *Radiation Research*, 484-495. Maruzen, Tokyo.
- Perry, K.L., Elledge, S.J., Mitchel, B.B., Marsh, L. & Walker, G.C. (1985). *umuDC* and *mucAB* operons whose products are required for UV light- and chemical-induced mutagenesis: UmuD, MucA and LexA share homology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4331-4335.
- Peterson, K.R. & Mount, D.W. (1987). Differential repression of SOS genes by unstable LexA41 (Tsl-1) protein causes a «split-phenotype» in *E.coli* K-12. *J. Mol. Biol.*, **193**, 27-40.
- Potter, P.M., Wilkinson, M.C., Fitton, J., Carr, F.J., Brennand, J., Cooper, D.P. & Margison, G.P. (1987). Characterisation and nucleotide sequence of *ogt*, the O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene of *E.coli*. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 9177-9193.
- Prakash, L., Stewart, J.W. & Sherman, F. (1974). Specific induction of transitions and transversions of G:C base pairs by 4NQO in iso-cytochrome c mutants of Yeast. *J. Mol. Biol.*, **85**, 51-65.
- Pulkrabek, P., Leffler, S., Grunberger, D. & Weinstein, I.B. (1979). Modification of deoxyribonucleic acid by a diol epoxyde of benzo(a)pyrene. Relation to deoxyribonucleic acid structure and conformation and effects on transcriptional activity. *Biochemistry*, **18**, 5128-5134.
- Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R. & Hofnung, M. (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *E.coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5971-5975.
- Quintanilla, M., Brown, K., Fee, F., Young, S. & Balmain, A. (1988). Oncogene mutation and amplification during initiation and progression stages of mouse skin carcinogenesis. *Growth factors, tumor promoters, and cancer genes*. 257-266. Alan R. Liss, Inc.
- Radman, M. (1975). Phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Molecular mechanism for repair of DNA*, part A, 355-367. Plenum Publishing Corp., New-York.
- Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E. & Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*, **300**, 149-152.
- Regan, J.D. & Setlow, R.B. (1974). Two forms of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogens and mutagens. *Cancer Res.*, **34**, 3318-3325.
- Ripley, L.S., Clark, A. & De Boer, J.B. (1986). Spectrum of spontaneous frameshift mutations: sequence of bacteriophage T4 *rII* gene frameshifts. *J. Mol. Biol.*, **191**, 601-613.

- Rodenhuis, S., Slebos, R.J.C., Boot, A.J.M., Evers, S.G., Mooi, W.J., Wagenaar, S.S., Van Bodegom, P.C. & Bos, J.L. (1988). Incidence and possible clinical significance of *K-ras* oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res.*, **48**, 5738-5741.
- Rostas, K., Morton, S.J., Picksley, S.M. & Lloyd, R.G. (1987). Nucleotide sequence and LexA regulation of *E.coli recN* gene. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 5041-5049.
- Salles, B., Lang, M.C., Freund, A-M., Paoletti, C., Daune, M. & Fuchs, R.P.P. (1983). Different levels of induction of RecA protein in *E.coli* (PQ10) after treatment with two related carcinogens. *Nucl. Acids Res.*, **11**, 5235-5242.
- Samson, L. & Cairns, J. (1977). A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature*, **267**, 281-283.
- Sancar, A., Clarcke, N.D., Griswold, J., Kennedy, W.J. & Rupp, W.D. (1981-a). Identification of the *uvrB* gene product. *J. Mol. Biol.*, **148**, 63.
- Sancar, A., Franklin, K.A., Sancar, G. & Tang, M.S. (1985). Repair of psoralen and acetylaminofluorene DNA adducts by ABC excinuclease. *J. Mol. Biol.*, **184**, 725-734.
- Sancar, A. & Rupert, C.S. (1978). Correction of the map location of the *phr* gene in *Escherichia coli*. *Mutation Res.*, **51**, 139-143.
- Sancar, A. & Rupp, D. (1983). A novel repair enzyme : UvrABC excision nuclease cuts a DNA strand on both sides of a damaged region. *Cell*, **33**, 249-260.
- Sancar, A. & Sancar, G.B. (1984). *Escherichia coli* DNA photolyase is a flavoprotein. *J. Mol. Biol.*, **172**, 223-227.
- Sancar, A. & Sancar, G.B. (1988). DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**; 29-67.
- Sancar, A., Wharton, P.R., Seltzer, S., Kacinsky, B.M., Clarke, N.D. & Rupp, W.D. (1981-b). Identification of the *uvrA* gene product. *J. Mol. Biol.*, **148**, 45-62.
- Sarasin, A., Daya-Grosjean, L., Suarez, H.G., Chrétien, B & Avril, M-F. (1988-a). Activation des oncogènes dans les tumeurs épithéliales isolées de malades atteints du *Xeroderma pigmentosum*. *m /s*, **4**, 643-646.
- Sarasin, A., Renault, G., Blanchet-Bardon, C., Boue, J. & Dumez, Y. (1988-b). Le *Xeroderma pigmentosum* : caractéristiques cliniques, génétiques et cellulaires. Développement d'un test anténatal. *m /s*, **4**, 608-617.
- Sarma, D.S.R., Rajalakshmi, S. & Farber, E. (1975). Chemical carcinogenesis : interactions of carcinogens with nucleic acids. *Cancer : a comprehensive treatise* (F.F. Becker, ed.), **1**, 235-287. Plenum Press, New-york.
- Schaaper, R.M., Danforth, B.N. & Glickmann, B.W. (1986). Mechanisms of spontaneous mutagenesis : an analysis of the spectrum of spontaneous mutation in the *Escherichia coli lacI* gene. *J. Mol. Biol.*, **189**, 273-284.
- Schaaper, R.M., Glickman, B.W. & Loeb, L.A. (1982). Role of depurination in mutagenesis by chemical carcinogens. *Cancer Res.*, **42**, 3480-3485.
- Schaaper, R.M., Kunkel, T.A. & Loeb, L.A. (1983). Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 487-491.

- Schiestl, R.H. (1989). Nonmutagenic carcinogens induce intrachromosomal recombination in yeast. *Nature*, **337**, 285-288.
- Seeberg, E. (1981). Strand cleavage at psoralen adducts and pyrimidine dimers in DNA caused by interaction between semi-purified *uvr*⁺ gene products from *Escherichia coli*. *Mutation Res.*, **82**, 11-22.
- Seeberg, E., Nissen-Meyer, J. & Strike, P. (1976). Incision of ultraviolet irradiated DNA by extracts of *E.coli* requires three gene products. *Nature*, **263**, 524-524.
- Seeburg, P.H., Colby, W.W., Capon, D.J., Goedel, D.V. & Levinson, A.D. (1984). Biological properties of human *c-Ha-ras1* genes mutated at codon 12. *Nature*, **312**, 71-75.
- Sekiguchi, M. & Nakabeppu, Y. (1987). Adaptive response : induced synthesis of DNA repair enzymes by alkylating agents. *TIG*, **3**, 51-54.
- Setlow, R.B. (1968). The photochemistry, photobiology, and repair of polynucleotides. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, **8**, 257-295.
- Shinagawa, H., Iwasaki, H., Kato, T. & Nakata A. (1988). RecA protein dependent cleavage of UmuD protein and SOS mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1806-1810.
- Shwartz, H., Shavit, O. & Livneh, Z. (1988). The role of exonucleolytic processing and polymerase-DNA association in by-pass of lesions during replication *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18277-18285.
- Singer, B. & Grunberger, D. (1983). Metabolic activation of carcinogens and mutagens *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens, Eds Plenum*, 97-141.
- Slilaty, S.N. & Little, J.W. (1987). Lysine-156 and serine-119 required for LexA repressor cleavage : a possible mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3987-3991.
- Smit, V.T.H.B.M., Boot, A.J.M., Smits, A.M.M., Fleurean, G.J., Cornelisse, C.J. & Bos, J.L. (1988). *KRAS* codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinoma. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 7773-7782.
- Smith, T.A.G. & Hays, J.B. (1985). Repair and recombination of nonreplicating UV-irradiated phage DNA in *E.coli*. Stimulation of RecF-dependent recombination by excision repair of pyrimidine dimers and other photoproducts. *Mol. Gen. Genet.*, **201**, 393-401.
- Stark, A.A., Essigman, J.M., Demain, A.M., Skopek, T.R. & Wogan, G.N. (1979). Aflatoxine B1 mutagenesis, DNA binding and adduct formation in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1343-1347.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. & Vogt, P.S (1976). DNA related to the transforming gene of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, **260**, 170.
- Steinborn, G (1978). *Uvm* mutants of *Escherichia coli* K-12 deficient in UV mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.*, **165**, 87-93.
- Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A., Terzaghi, E & Inouye, M (1966). Frameshift mutations and genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **31**, 77-84.
- Sugimura, T. Ed. (1981). The nitroquinolines. *Carcinogenesis*, **6**, 1-153. Raven Press, New-York.

- Sutcliffe, J.G. (1979). Complete nucleotide sequence of the *E.coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 77-90.
- Sutherland, B.M., Court, D. & Chamberlin, M.J. (1972). Studies of the DNA photoreactivating enzyme from *Escherichia coli*. Transduction of the *phr* gene by bacteriophage λ . *Virology*, **48**, 87-92.
- Tada, M. & Tada, M. (1975). Seryl-tRNA Synthetase and activation of carcinogen, 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. *Nature*, **255**, 510-512.
- Tada, M. & Tada, M. (1976). Main binding site of the carcinogen 4NQO in nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta.*, **454**, 558-566.
- Takebe, H., Furuyama, J., Miki, Y. & Kondo, S. (1972). High sensitivity of *Xeroderma pigmentosum* cells to the carcinogen 4NQO. *Mutat. Res.*, **15**, 98-100.
- Tang, M-S. (1985). Repair of psoralen and acetylaminofluorene DNA adducts by ABC excinuclease. *J. Mol. Biol.*, **184**, 725-734.
- Tennant, R.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Zeiger, E., Haseman, J.K., Spalding, J., Caspary, W., Resnick, M., Stasiewicz, S., Anderson, B. & Minor, R. (1987). Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from *in vitro* genetic toxicity assays. *Science*, **236**, 933-941.
- Teo, I., Sedgwick, B., Kilpatrick, M.W., McCarthy, T.V. & Lindhal T. (1986). The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E.coli*. *Cell*, **45**, 315-324.
- Thomas, D.C., Kunkel, T.A., Casna, N.J., Ford, J.P. & Sancar, A. (1986). Activities and incision patterns of ABC excinuclease on modified DNA containing single-base mismatches and extrahelical bases. *J. Biol. Chem.*, **31**, 14496-14505.
- Thomas, D.C., Levy, M.D., Sancar, A. (1985). Amplification and purification of UvrA, UvrB, and UvrC proteins of *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.*, **260**, 9875-9883.
- Topal, M.D. (1988). DNA repair, oncogenes and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **9**, 691-696.
- Van Houten, B., Gamper, H., Hearst, J.E., Sancar A. (1986). Construction of DNA substrates modified with psoralen at a unique site and study of the action mechanism of ABC excinuclease on these uniformly modified substrates. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14135-14141.
- Van Houten. B., Gamper, B, Hearst, J.E. & Sancar, A. (1988). Analysis of sequential steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli* using synthetic substrates containing single psoralen adducts. *J. Biol. Chem.*, **263**, 16553-16560.
- Van Houten. B. & Sancar, A. (1987). Repair of N-methyl-N'nitro-N-nitrosoguanidine induced DNA damage by ABC excinuclease. *J. Bacteriol.*, **169**, 540-545.
- Varmus, H.E. (1984). The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu. Rev. Genet.*, **18**, 553-612.
- Visvanathan, K.V., Pocock, R.D. & Summerhayes, I.C. (1988). Preferential and novel activation of *H-ras* in human bladder carcinomas. *Oncogene Res.*, **3**, 77-86.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Presinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M.M. & Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.*, **319**, 525-532.

- Volkert, M.R. (1988). Adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage. *Env. Mol. Mutag.*, **11**, 241-255.
- Wagner, R., Dohet, C., Jones, M., Doutriaux, M-P., Hutchinson, F. & Radman, M. (1984). Involvement of *E.coli* mismatch repair in DNA replication and recombination. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **49**, 611-615.
- Walker, G.C. (1984). Mutagenesis and inducible response to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **48**, 60-93.
- Walker, G.C. (1985). Inducible DNA repair systems. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 425-457.
- Wallace, S.S. (1988). AP endonucleases and DNA glycosylases that recognize oxidative DNA damage. *Env. Mol. Mutag.*, **12**, 431-477.
- Wang, T.V. & Smith, K. C. (1983). Mechanism for Rec-F dependent and Rec-B dependent pathways of postreplication repair in UV-irradiated *Escherichia coli* *uvr B*. *J. Bacteriol.*, **156**, 267.
- Weinberg, R. (1988). Les anti-oncogènes. *Pour la science*, **133**, 72-79.
- Weisburger, J.H. & Williams, G.M. (1975). Metabolism of chemical carcinogens. *Cancer : a comprehensive treatise* (F. F. Becker, ed.), **1**, 185-234. Plenum Press, New-York.
- Westra, J.G., Kriek, E. & Hintenhausen, H. (1976). Identification of the persistently bound form of the carcinogen N-acetyl-2 aminofluorene to rat liver DNA *in vivo*. *Chem. Biol. Interact.*, **15**, 149-164.
- Wood, R.D. & Hutchinson, F. (1987). Changes in DNA base sequence induced by targeted mutagenesis of λ phage by ultraviolet light. *J. Mol. Biol.*, **173**, 273-291.
- Wood, R.D. & Sedgwick, S.G. (1986). Molecular aspect of mutagenesis. *Mutagenesis*, **1**, 399-405.
- Yamasaki, H., Pulkrabek, P., Grunberger, D. & Weinstein, I.B. (1977). Differential excision from DNA of the C8 and N2 guanosine adducts of N-acetyl-2-aminofluorene by single strand-specific endonucleases. *Cancer Res.*, **37**, 3756-3760.
- Yeung, A.T., Mattes, W.V., Oh, E.Y. & Grossman, L. (1983). Enzymatic properties of purified *Escherichia coli* UvrABC proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **80**, 6157-6161.
- Yoakum, G.H. & Grossman, L. (1981). Identification of the *E.coli* UvrC protein. *Nature*, **292**, 171.
- Yoshida, S., Koiwai, O., Suzuki, R. & Tada, M. (1984). Arrest of DNA elongation by DNA polymerases at guanine adducts on 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide-modified DNA template. *Cancer Res.*, **44**, 1867-1870.
- Young, D.A. & Smith, K.C. (1978). Genetic location of the *phr* gene of *Escherichia coli*. *Mutation Res.*, **51**, 133-137.
- Zarbl, H., Sukumar, S., Arthur, A.V., Martin-Zanca, D. & Barbacid, M. (1987). Direct mutagenesis of *Ha-ras1* oncogene by MNU during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature*, **315**, 382-386.



RESUME

L'oxyde de nitro-4-quinoléine (4NQO) est un cancérigène et un mutagène puissant qui se fixe de façon covalente sur l'ADN par l'intermédiaire d'une forme ultime, produit de sa métabolisation dans la cellule. Les principales lésions induites sont formées sur la guanine par substitution sur l'azote 2 (adduit dGuo-N2-AQO ou N2-G) ou sur le carbone 8 (adduit dGuo-C8-AQO ou C8-G). *In vivo*, l'adduit majeur N2-G représente 50% de la modification totale contre 30% pour l'adduit C8-G. Le modèle de cancérigène ultime précédemment mis au point au laboratoire, l'Ac-4HAQO, permet de modifier l'ADN *in vitro* préférentiellement en N2 ou en C8 de la guanine.

L'utilisation d'un système de mutagénèse en avant nous permet maintenant d'étudier les principales propriétés biologiques de chacun des deux adduits N2-G et C8-G. Il apparaît que l'adduit majeur N2-G est le principal responsable de la forte toxicité du 4NQO; de plus, il ressort de notre étude que le N2-G est au moins trois fois plus mutagène que le C8-G et représente plus de 80% de la mutagénèse induite *in vivo* par le 4NQO. L'adduit N2-G induit spécifiquement des transitions G en A et des transversions G en T dans les mêmes proportions; l'adduit C8-G est capable d'induire également ces deux types de mutations mais les transversions G en T pourraient être imputables aux sites apuriques créés *in vitro* par cet adduit instable.

L'analyse de la base voisine de la mutation montre que la totalité des transversions induites par l'adduit N2-G apparaît dans les séquences 5'Purine-G. Ce type de séquence se révèle alors quatre fois plus mutagène que les séquences 5'Pyrimidine-G, phénomène qui pourrait expliquer la faible proportion de G en T observée précédemment dans d'autres systèmes de mutagénèse avec le 4NQO. Cette influence de la base voisine sur la mutagénèse n'est apparemment pas explicable par une différence de fixation ou de réparation de l'adduit N2-G dans les séquences 5'Pu-G mais plutôt par le traitement biologique permettant la conversion de cette lésion en mutation. La conformation de la double hélice induite dans ces séquences par le N2-G procurerait alors à l'ADN polymérase la possibilité supplémentaire d'incorporer une adénine face à l'adduit N2-G.

MOTS CLEFS :

- Cancérogénèse chimique
- 4NQO
- Adduits
- Toxicité
- Mutagénèse