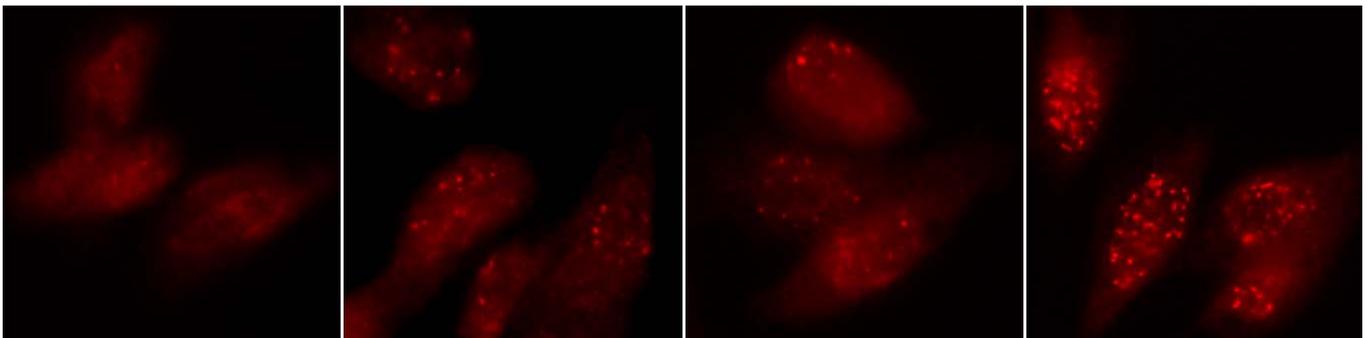


- Thèse présentée pour obtenir le grade de
- Docteur de l'Université Louis Pasteur
- Strasbourg I
-
- Discipline : Aspects moléculaires et
- cellulaires de la biologie
-
- par Nicolas Lévy

XRCC1

XRCC1, un élément clef de la réparation des dommages de l'ADN couplée à la réplication



Travail réalisé au sein du département Intégrité Du Génome, UMR 7175 du CNRS, ESBS
Bd Sébastien Brant, BP 10413, 67412 Illkirch CEDEX

Thèse soutenue publiquement le 22 novembre 2007

Directeur de thèse : Dr. Josiane Ménissier de Murcia

Directeur de thèse : Dr. Gilbert de Murcia

Rapporteur interne : Pr. Philippe Carbon

Rapporteur externe : Dr. Janet Hall

Rapporteur externe : Dr. Pablo Radicella

Examineur : Dr. Domenico Maiorano

Invité : Dr. Anne Bresson

*A la mémoire de
Josiane Ménissier de Murcia*

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du département Intégrité Du Génome de l'UMR 7175 à l'ESBS, et a été pour moi une période formidable où j'ai côtoyé des personnes de grande valeur, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je tiens tout d'abord à remercier Gilbert et Josiane de Murcia qui m'ont accueilli dans leur département en janvier 2004 et ont été pour moi de véritables « parents » scientifiques. J'ai eu le plaisir d'avoir Josiane comme directrice de thèse et comme collègue pendant 18 mois, puis malheureusement elle a été forcée de se détourner du laboratoire. J'aurais vraiment aimé qu'elle puisse lire cette thèse, mais, à notre grand regret à tous, elle nous a quittés trop tôt. Merci à toi, Gilbert, d'avoir dès lors supervisé mes travaux, tu as été un chef toujours disponible et à l'écoute de mes opinions. Je te souhaite une retraite paisible et heureuse en tant que « Papirazzi ».

Un grand merci aux Dr. Janet Hall, Pr. Philippe Carbon et Dr. Pablo Radicella qui m'ont fait le plaisir d'accepter de juger mon travail de thèse et d'assumer la tâche de rapporteur.

Valérie, je garderai un très bon souvenir de notre « road trip » vers la Hollande et j'ai beaucoup apprécié le travail à tes côtés. Avec Françoise, vous êtes les deux nouvelles chefs du labo, duo de choc et de charme qui guidera le département IDG vers de nouveaux sommets !

Anne, merci pour tout, notre travail en commun sur XRCC1 et p58 aura été un réel plaisir. Je te souhaite bonne chance dans tes prochains sujets de recherche et j'espère que les purifications de protéines ne seront plus aussi laborieuses.

Jean-Christophe, mon cher voisin de bureau. Toutes nos conversations sur les dernières technologies, et tous nos petits délires vont réellement me manquer (il faudra vraiment mettre au point ce destructeur de mouches laser !)

Aline, notre petite souris du labo. Tu as été une voisine de bureau super ! Merci d'avoir toujours été prête à rendre service, et merci pour tes tartes au citron !

Adeline, tu as abandonné l'ESBS voilà quelques temps déjà, mais à mon arrivée ici tu as été, avec Aline, une des personnes qui ont fait que je me suis tout de suite senti chez moi. Ta spontanéité et ton ouverture d'esprit ont grandement participé à la bonne ambiance de l'époque.

Merci à toi, Delphine, ton calme, ta gentillesse et tes délicieuses crêpes vont me manquer !

Tonie, merci d'avoir amené par ta présence un peu du soleil du Liban dans notre bureau d'alsaciens.

Elise, notre « poussin » au labo. Merci pour ta fraîcheur et ton sourire. Je te promets que j'ai enfin compris que la Normandie c'est à l'Ouest de la France (Mais avoue que ce n'est pas logique !)

Véronique, notre saxophoniste du labo, j'espère avoir un jour le plaisir de t'entendre jouer !

Rosy et Kuan, les deux « grandes sœurs » du labo, votre compagnie aura été un vrai plaisir.

Merci à toi, Claude, pour ton calme, ton humour et ta gentillesse. Tu auras été un voisin de paillasse génial, tu mérites bien ton rôle de Père Noël du labo.

Patrick, je n'oublierai pas nos conversations sur l'informatique, et nos éternels débats, amicaux bien sûr, Mac contre PC.

Najat, tous mes meilleurs vœux à toi et à ta famille qui s'est agrandie récemment avec l'arrivée de la petite Sirine.

Je remercie aussi tout le reste du département IDG : Marie-Pierre, Peter, Borbala, Marc, Jérôme, Sandrine, Elisabeth, Régine, Agnès, Valérie et Brigitte, ainsi que tous les jeunes de passage sans qui ces années n'auraient pas eu la même saveur : Claire, Céline, Aurélie, Sadan, Chloé, Dominique, Camille et tous les autres.

Un grand merci au Dr. Marcel Méchali, qui a accepté que je vienne apprendre les techniques d'analyse de la réplication de l'ADN dans les extraits d'œufs de xénope chez lui à l'IGH de Montpellier.

Mille mercis à toi, Domenico, pour tout le temps que tu m'as accordé, pour ta gentillesse et pour ton sourire permanent. J'ai beaucoup appris grâce à toi.

Bénédicte, merci de m'avoir aidé dès que j'en avais besoin, ta compagnie, ton petit accent méditerranéen chantant auront été un réel plaisir durant ces semaines à Montpellier.

Merci enfin à Etienne Weiss, qui a eu la judicieuse idée de me conseiller, voilà près de quatre ans, d'aller toquer aux portes du quatrième étage de l'ESBS pour découvrir les merveilles qui s'y cachent.

Et merci surtout à toute ma famille qui a toujours été là pour moi tout au long de ces années, aux collègues de l'Addal qui m'ont beaucoup appris et à tous mes amis qui ont su me changer les idées quand j'en avais besoin !

Table des matières

Table des matières.....	1
Liste des figures	7
Liste des abréviations et acronymes	9
INTRODUCTION	11
I. La réponse cellulaire aux dommages de l'ADN	12
1. Les différents types de lésions de l'ADN	12
A) <i>Les lésions spontanées de l'ADN</i>	<i>12</i>
B) <i>Les alkylations de base</i>	<i>14</i>
C) <i>Les dommages oxydatifs</i>	<i>14</i>
D) <i>Les lésions de l'ADN photo-induites</i>	<i>18</i>
E) <i>Les coupures physiologiques de l'ADN</i>	<i>18</i>
2. Les points de contrôle de l'intégrité du génome.....	19
A) <i>Les protéines kinases reliées aux PI3 kinases</i>	<i>21</i>
1) <i>La kinase ATM</i>	<i>21</i>
2) <i>La kinase ATR.....</i>	<i>22</i>
3) <i>La kinase DNA-PK</i>	<i>22</i>
B) <i>Le point de contrôle G1/S.....</i>	<i>23</i>
C) <i>Le point de contrôle intra-S.....</i>	<i>24</i>
D) <i>Le point de contrôle G2/M</i>	<i>25</i>
E) <i>Points de contrôle du cycle cellulaire et cancer.....</i>	<i>26</i>
II. Les différentes voies de réparation de l'ADN chez les eucaryotes.....	27
1. La réparation des mésappariements de bases	27
A) <i>Reconnaissance du mésappariement.....</i>	<i>27</i>
B) <i>Ciblage du brin néo-synthétisé.....</i>	<i>30</i>
C) <i>Réparation du mésappariement</i>	<i>30</i>
2. La réparation par excision de nucléotide	31
A) <i>Le mécanisme du NER</i>	<i>31</i>
1) <i>La reconnaissance de la lésion</i>	<i>33</i>
2) <i>La délimitation de la lésion</i>	<i>33</i>

3) Incision du brin d'ADN portant la lésion	34
4) Elimination de l'oligonucléotide contenant la lésion.....	34
5) Synthèse d'ADN, remplissage de la brèche.....	34
B) Les pathologies liées à un défaut du NER.....	34
1) Xeroderma pigmentosum	35
2) Le syndrome de Cockayne.....	36
3) La trichothiodystrophie	36
3. La réparation des cassures double-brin de l'ADN	37
A) <i>La recombinaison homologue</i>	39
B) <i>La recombinaison non homologue</i>	40
1) Le mécanisme de base du NHEJ	42
2) La sous-unité catalytique de DNA-PK.....	43
a) <i>Les rôles multiples de DNA-PKcs</i>	43
b) <i>Séquence et structure de DNA-PKcs</i>	43
c) <i>Les cibles de DNA-PKcs</i>	45
3) Les voies alternatives de recombinaison non homologue.....	46
a) <i>L'ADN-ligase III</i>	47
b) <i>La poly(ADP-ribose) polymérase 1</i>	47
c) <i>XRCC1</i>	48
d) <i>La polynucléotide kinase</i>	48
4. La réparation des cassures simple-brin de l'ADN, la réparation par excision de base	49
A) <i>Le mécanisme de réparation des cassures simple-brin de l'ADN</i>	51
1) Détection de la lésion – BER.....	51
2) Détection de la lésion - SSB.....	52
3) Traitement des extrémités de la cassure	53
4) Remplissage de la brèche	54
5) Ligation des deux extrémités de la lésion	56
B) <i>La protéine XRCC1</i>	57
1) Les domaines structuraux et fonctionnels de XRCC1.....	59
a) <i>Le domaine N-terminal</i>	59
b) <i>Le domaine BRCT1(BRCA1 C-Terminal domain 1)</i>	62
c) <i>Le domaine intermédiaire « linker »</i>	63
d) <i>Le domaine BRCT2</i>	64
2) Les lignées cellulaires déficientes en XRCC1	65
a) <i>Hypersensibilité aux agents génotoxiques</i>	66
b) <i>Déficience dans la réparation des cassures simple-brin</i>	66

c)	<i>Déficiences dans la réparation des cassures double-brin</i>	67
d)	<i>Perturbation de la réplication de l'ADN</i>	68
3)	Le polymorphisme génétique de XRCC1	70
a)	<i>Le SNP R194W</i>	70
b)	<i>Le SNP R280H</i>	71
c)	<i>Le SNP R399Q</i>	72
d)	<i>Les mutations ponctuelles de XRCC1</i>	73
C)	<i>La poly (ADP-ribose) polymérase-1</i>	76
1)	La superfamille PARP	76
a)	<i>PARP-1</i>	78
b)	<i>PARP-2</i>	78
c)	<i>Les tankyrases</i>	79
d)	<i>Les CCCH-PARP</i>	79
e)	<i>Les macro-PARP</i>	80
f)	<i>Les autres PARP</i>	80
2)	La réaction de poly(ADP-ribosyl)ation	81
3)	Les rôles physiologiques de la poly(ADP-ribosyl)ation	82
a)	<i>Réparation des cassures de l'ADN et survie cellulaire</i>	82
b)	<i>Plasticité de la chromatine, régulation de la transcription et de la réplication</i>	83
4)	Le catabolisme du PAR, la poly(ADP-ribose)glycohydrolase	85
III.	La réplication de l'ADN chez les eucaryotes	87
1.	Le mécanisme de la réplication	87
A)	<i>L'initiation de la réplication</i>	87
1)	Les origines de réplication	89
2)	La reconnaissance des origines de réplication	89
3)	Le complexe de pré-réplication	89
4)	L'activation des origines de réplication	90
B)	<i>Le complexe ADN polymérase α-primase</i>	91
1)	Structure et fonction de la primase	91
2)	Les partenaires du complexe Pol α -primase	94
3)	Le rôle de la primase dans la réparation de l'ADN et les points de contrôle du cycle cellulaire	94
C)	<i>L'élongation des brins d'ADN</i>	96
1)	L'échange d'ADN polymérase	96
2)	La maturation des fragments d'Okazaki	98
3)	L'hélicase réplivative	99

1) La réplication translésionnelle.....	101
A) <i>Les polymérases translésionnelles.....</i>	<i>101</i>
B) <i>Le recrutement des polymérases translésionnelles.....</i>	<i>103</i>
IV. Objectifs de mon travail de thèse.....	104
RESULTATS.....	106
1^{ère} PARTIE.....	107
XRCC1 est phosphorylé par DNA-PK en réponse aux dommages de l'ADN	107
I. Introduction	108
II. Publication n° 1 :	110
III. Discussion	121
A) <i>XRCC1 est associé à DNA-PK in vitro</i>	<i>121</i>
B) <i>Le domaine BRCT1 de XRCC1 est phosphorylé in vivo sur sa sérine 371 par DNA-PK en réponse aux rayonnements ionisants.....</i>	<i>121</i>
C) <i>La phosphorylation de la sérine 371 par DNA-PK contrôle la transition entre une forme dimère et une forme monomère de XRCC1</i>	<i>124</i>
D) <i>XRCC1 stimule l'activité de DNA-PK in-vitro.....</i>	<i>125</i>
E) <i>La phosphorylation de la sérine 371 de XRCC1 est requise pour la réparation efficace des cassures double-brin de l'ADN</i>	<i>126</i>
F) <i>XRCC1 constitue un relais moléculaire entre les voies de SSB et DSB.....</i>	<i>127</i>
2^è PARTIE	129
XRCC1 interagit avec p58 pour réguler l'avancement de la fourche de réplication sur un ADN endommagé.....	129
I. Introduction	130
II. Publication n° 2 :	132
III. Discussion	161
A) <i>XRCC1 interagit avec la sous unité p58 du complexe ADN polymérase α-primase ...</i>	<i>161</i>
B) <i>La liaison du poly(ADP-ribose) par p58 inhibe fortement l'activité de l'ADN primase p48-p58</i>	<i>161</i>
C) <i>Les cellules surexprimant le domaine BRCT1 de XRCC1 présentent une activité PARP élevée.....</i>	<i>162</i>

D) La surexpression du domaine BRCT1 de XRCC1 entraîne une accumulation des cellules traitées par agent alkylant en début de phase S du cycle cellulaire	163
E) Le domaine BRCT1 de XRCC1 ralentit la réplication des ADN endommagés en inhibant la formation de fourches de réplication fonctionnelles.....	165
F) Intérêt biologique du modèle	165
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	167
I. XRCC1 et PARP-1 dans la coordination entre réparation et réplication de l'ADN	168
II. XRCC1 et PARP-1 dans la transition entre SSBP et DSBP.....	171
III. XRCC1 et PARP-1 dans les thérapies contre le cancer	172
ANNEXE TECHNIQUE	176
I. Test d'activité kinase pour DNA-PK	177
II. Far-western blot.....	177
III. Synthèse de poly(ADP-ribose)	178
IV. Test d'activité primase	179
V. Analyse du cycle cellulaire par incorporation de BrdU.....	179
VI. Etude de la réplication de l'ADN dans les extraits d'œuf de <i>Xenopus laevis</i>.....	180
1) Préparation des extraits d'œufs de xénope.....	180
2) Cinétique de réplication.....	181
3) Analyse de la taille des ADN répliqués par électrophorèse sur gel alcalin.....	181
4) Analyse des protéines associées à la chromatine	182
BIBLIOGRAPHIE.....	183
Liste des communications écrites et orales	220

LISTE DES FIGURES

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des différents types de lésions dans l'ADN	13
Figure 2 : Différentes lésions de l'ADN : désaminations et alkylations de base	15
Figure 2bis : Différentes lésions de l'ADN : dommages oxydatifs	16
Figure 2ter : Différentes lésions de l'ADN : lésions photoinduites.....	17
Figure 3 : Réponse cellulaire aux lésions de l'ADN et points de contrôle du cycle cellulaire	20
Figure 4 : Réparation des mésappariements de bases (MMR)	28
Tableau 1 : Composition et fonctions des complexes Mut dans le MMR	29
Figure 5 : Réparation par excision de nucléotide (NER)	32
Figure 6 : Réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue	38
Figure 7 : Réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison non-homologue.....	41
Figure 8 : Organisation, structure et fonctionnement de DNA-PKcs.....	44
Figure 9 : Réparation des cassures simple-brin de l'ADN	50
Figure 10 : Alignement multiple de séquences de XRCC1.....	58
Figure 11 : Domaines d'interactions protéiques de XRCC1	60
Figure 12 : Structures tridimensionnelles des domaines BRCT1 et BRCT2 de XRCC1.....	61
Figure 13 : Métabolisme du poly(ADP-ribose) lors de la réparation des lésions de l'ADN.....	75
Figure 14 : La superfamille PARP	77
Figure 15 : Initiation de la réplication chez les eucaryotes	88
Figure 16 : Le complexe ADN polymérase α -primase : structure et interactions	92
Tableau 2 : Les principales ADN polymérases humaines.....	95
Figure 17 : Elongation des brins d'ADN et maturation des fragments d'Okazaki.....	97
Figure 18 : Différentes étapes de la réplication translésionnelle.....	100
Figure 19 : Modèle d'un dimère de domaines BRCT1 de XRCC1.....	123
Figure 20 : Modèle de la transition SSBR/DSBR organisée par XRCC1 et DNA-PK	128
Figure 21 : XRCC1 et p53 dans le couplage entre réparation et réplication de l'ADN	164
Figure 22 : Domaines d'interactions protéiques de XRCC1	169
Figure 23 : XRCC1 et PARP-1 dans la coordination entre réparation et réplication de l'ADN.....	170

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations et acronymes

aa :	acide aminé
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AP (site) :	Site abasique (apurique/apyrimidique)
ARN :	Acide ribonucléique
AT :	Ataxie telangiectasique
ATM :	Ataxia telangiectasia mutated
ATP :	Adénosine triphosphate
ATR :	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BER :	Réparation par excision de base
BRCT :	BRCA1 C-terminal domain
BrdU :	5-bromodésoxyuridine
BSA :	Albumine sérique bovine
CHO :	Ovaire de hamster chinois
Ci :	Curie
cpm :	coups par minute
CS :	Syndrome de Cockayne
DMEM :	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA-PK :	Protéine kinase dépendante de l'ADN
DSB :	Cassure double-brin de l'ADN
DSBR :	Réparation des cassures double-brin de l'ADN
DTT :	Dithiothreitol
EDTA :	Ethylene diamine tetraacetic acid
kDa :	kilo Dalton
LigIII :	ADN ligase III
MCM :	Minichromosome maintenance
MMR :	Réparation des mésappariements de base
MMS :	Méthyle méthane sulfonate
MNNG :	N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MNU :	N-méthyl-N-nitrosourée

Liste des abréviations

NAD :	Nicotinamide adénosine dinucléotide
NER :	Réparation par excision de nucléotide
NHEJ :	Recombinaison non-homologue
NLS :	Signal de localisation nucléaire
ORC :	Complexe de reconnaissance de l'origine
PAR :	Poly(ADP-ribose)
PARG :	Poly(ADP-ribose)glycohydrolase
PARP :	Poly(ADP-ribose)polymérase
PBS :	Phosphate buffered saline
PCNA :	Proliferating cell nuclear antigen
PNK :	Polynucléotide kinase
Pol α :	ADN polymerase α
Pol β :	ADN polymerase β
RH :	Recombinaison homologue
RPA :	Protéine de réplication A
rpm :	Révolutions par minute
SCE :	Echanges de Chromatides Sœurs
SCID :	Severe combined immuno-deficiency
SDS-PAGE :	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SSB :	Cassure simple-brin de l'ADN
SSBR :	Réparation des cassures simple-brin de l'ADN
TTD :	Trychothiodystrophie
UV :	Ultraviolet
XP :	Xeroderma pigmentosum
XRCC1 :	X-ray repair cross complementing group 1

INTRODUCTION

Le maintien de l'intégrité du génome est un combat majeur que la cellule doit mener quotidiennement. En effet, l'acide désoxyribonucléique (ADN), support de son information génétique, subit chaque jour des milliers d'attaques de provenances diverses (Lindahl, 1993). Des agents environnementaux (agents chimiques, rayonnements ionisants) ou endogènes (métabolites, radicaux libres) peuvent ainsi induire différents types de lésions dans l'ADN. Ces lésions doivent être détectées rapidement et réparées fidèlement afin d'éviter la transmission de mutations à la descendance. Au cours de l'évolution, la cellule eucaryote a développé différentes voies de réparation spécifiques pour répondre à ce stress génotoxique, ainsi que des mécanismes assurant leur coordination avec d'autres processus cellulaires comme la réplication de l'ADN et la division cellulaire.

I. La réponse cellulaire aux dommages de l'ADN

1. Les différents types de lésions de l'ADN

La grande variété de lésions pouvant compromettre l'intégrité de la double hélice ADN est explicable par la diversité des agents génotoxiques mis en cause, ainsi que par la multitude des cibles potentielles au sein de la molécule d'ADN. La figure 1a-b récapitule différents types d'agents génotoxiques ainsi que les différents types de lésions qu'ils induisent dans l'ADN.

A) Les lésions spontanées de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique est une molécule stable. Il arrive toutefois que des réactions spontanées d'hydrolyse viennent la modifier. On peut par exemple observer des désaminations spontanées de bases ou même l'hydrolyse de la liaison glycosidique entraînant l'élimination complète d'une base de l'ADN, résultant en un site abasique « AP » (dépuration, dépyrimidation) (Lindahl, 1993). La figure 2a présente l'exemple de la désamination de la cytosine.

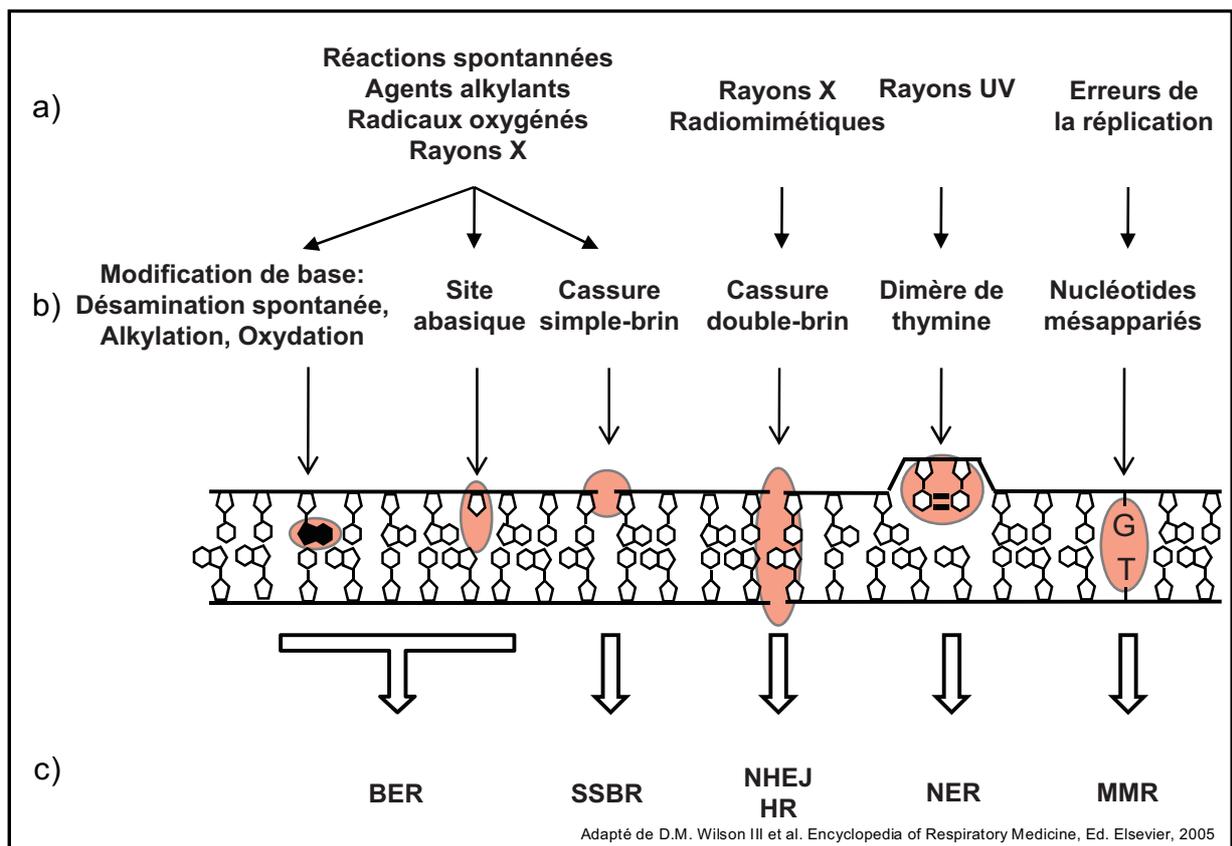


Figure 1 : Représentation des différents types de lésions dans l'ADN.

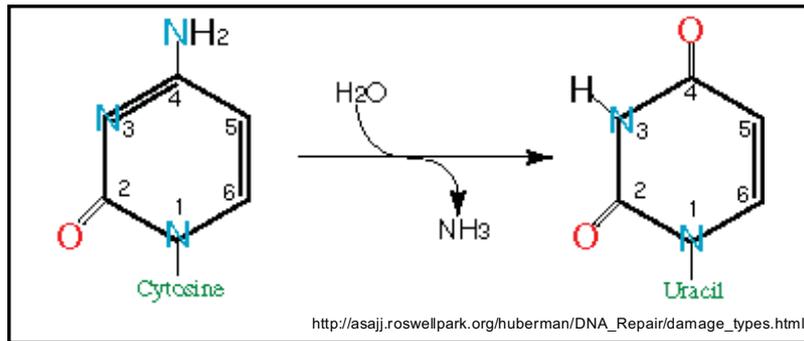
a) Différents agents génotoxiques b) Différents types de lésions qu'induisent ces agents c) Voies de réparation impliquées dans chaque cas : réparation par excision de base (BER), réparation des cassures simple-brin de l'ADN (SSBR), recombinaison non homologue (NHEJ), recombinaison homologue (HR), réparation par excision de nucléotide (NER) et réparation des mésappariements (MMR).

B) Les alkylations de base

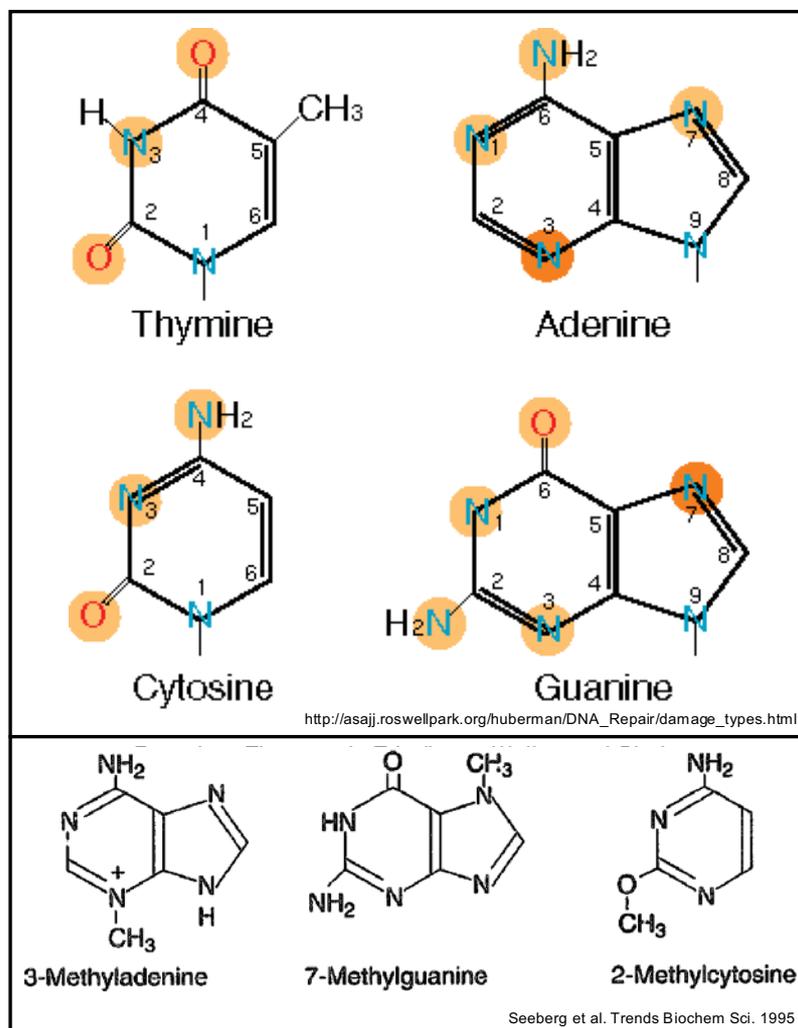
Les agents alkylants sont des composés chimiques qui vont greffer de manière covalente un groupement alkyle (méthyle ou éthyle le plus souvent) sur un centre nucléophile des bases ou des phosphates de l'ADN. Diverses molécules d'origine endogène ou exogène ont la faculté d'alkyler l'ADN. Le N-méthyle-N-nitrosoamine contenu dans la fumée de tabac en est un exemple. Les modifications des bases ou les cassures de l'ADN résultant de ces modifications compromettent la stabilité du génome. A ce titre, les agents alkylants sont couramment utilisés pour induire la mort des cellules tumorales dans les thérapies de lutte contre le cancer. La figure 2b présente les sites nucléophiles des différentes bases de l'ADN pouvant être alkylés. La 3-méthyladénine, la 7-méthylguanine et la 2-méthylcytosine sont des exemples classiques de ce type de réaction (Lindahl et al., 1982) (Seeberg et al., 1995).

C) Les dommages oxydatifs

Les cellules eucaryotes par leur métabolisme aérobie sont particulièrement exposées aux dommages de types oxydatifs. Certains métabolites cellulaires, tels le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux libres oxygénés (ion superoxide ou radical hydroxyle) sont des espèces hautement réactives qui peuvent entraîner une oxydation des bases de l'ADN en de multiples points. Plus de cent modifications oxydatives de l'ADN ont été identifiées à ce jour (Beckman and Ames, 1999) (Muller et al., 1998). Les radicaux libres peuvent aussi être le produit de l'ionisation locale du milieu cellulaire sous l'effet d'une exposition à des rayonnements ionisants de haute énergie (rayons X, rayons γ). Certains exemples typiques de bases oxydées et le détail de l'oxydation de la thymine en thymine glycol sont présentés dans la figure 2 bis-a et -b. L'attaque des radicaux libres oxygénés peut aussi avoir pour cible le ribose des nucléotides. Dans ce cas, le squelette ribose-phosphate de la molécule d'ADN peut être interrompu, il en résulte une cassure simple-brin (SSB) ou double-brin (DSB) de l'ADN. Les rayonnements ionisants, ou les drogues radiomimétiques (bléomycine) induisent un grand nombre de dommages oxydatifs localisés provoquant en majorité des SSB, ainsi que des DSB dans la molécule d'ADN survenant directement ou indirectement du fait de la proximité de deux SSB (Wang et al., 1998) (Pogozelski and Tullius, 1998).

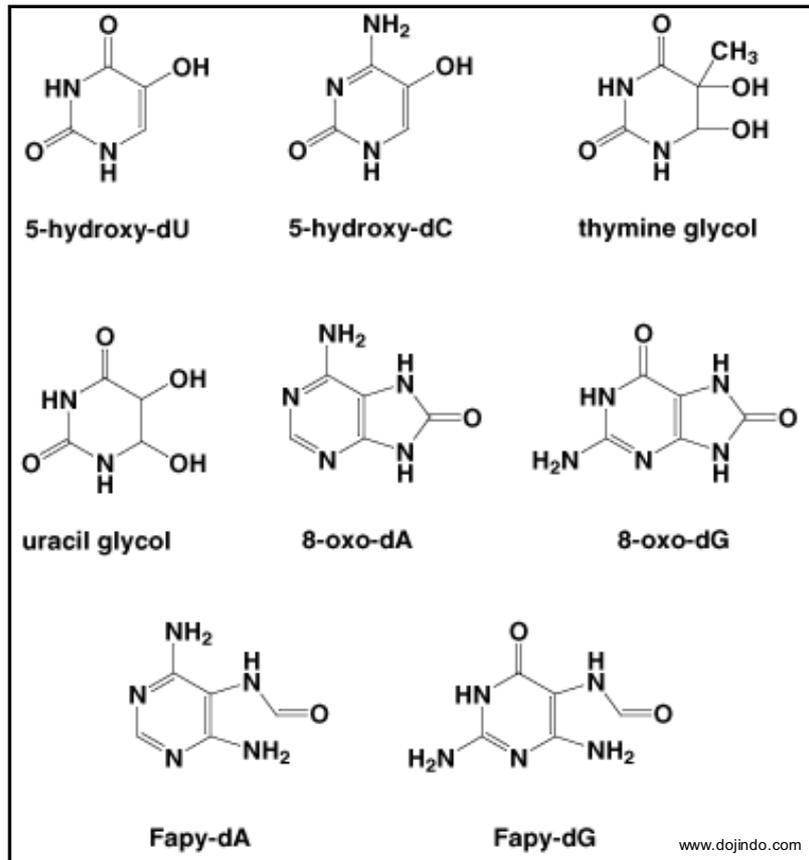


a) Exemple de désamination spontanée de la cytosine par hydrolyse

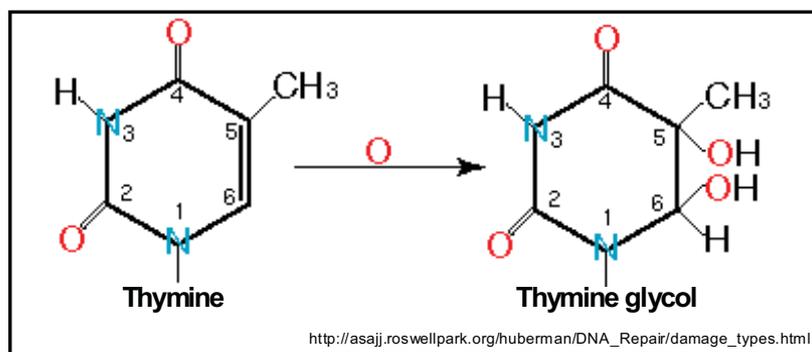


b) Représentation des multiples sites nucléophiles alkylables (surlignés), exemples de bases alkylées

Figure 2 : Différentes lésions de l'ADN - désaminations et alkylations de base

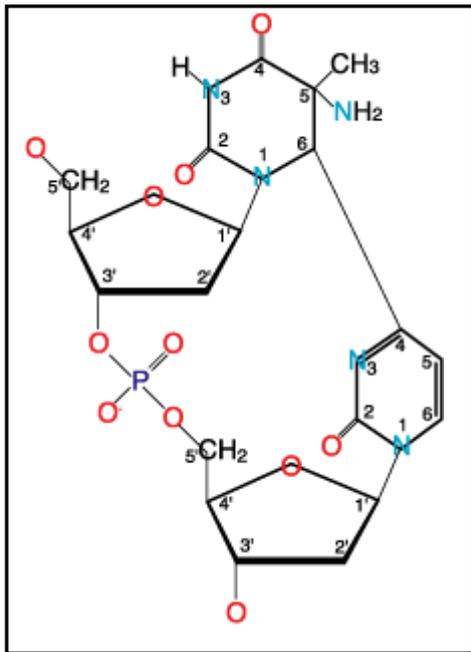


a) Représentation des différentes modifications de bases par oxydation

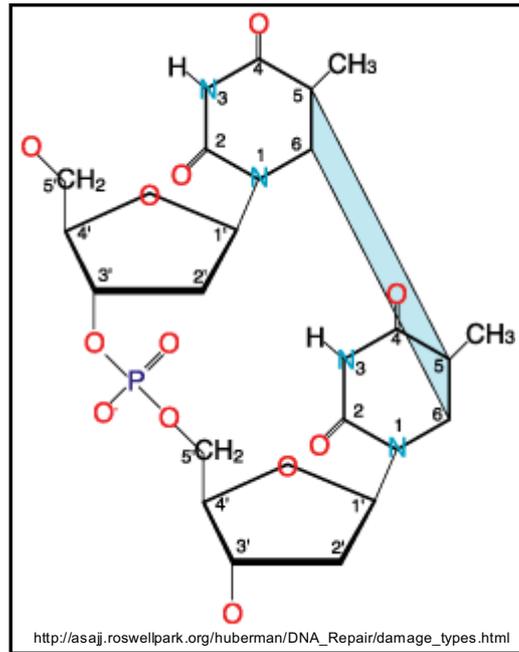


b) Exemple de l'oxydation de la thymine

Figure 2 bis : Différentes lésions de l'ADN - dommages oxydatifs



a) 6-4 photoproduits



b) Dimères de thymine (CPD)

Figure 2 ter : Différentes lésions de l'ADN - lésions photoinduites

Les liaisons formées entre les deux bases adjacentes sont beaucoup plus courtes que l'espace normal entre celles-ci. Il en résulte une courbure de la molécule d'ADN au niveau de la lésion : 44° dans le cas des 6-4 photoproduits et 9° au niveau des CPD.

D) Les lésions de l'ADN photo-induites

Les rayonnements ultra-violet (UV) peuvent induire la formation de photoproduits caractérisés par la liaison covalente de deux pyrimidines (thymine ou cytosine) adjacentes sur un brin d'ADN. Ces liaisons qualifiées de « crosslinking » intramoléculaire entraînent une distorsion de la molécule d'ADN empêchant la progression de la machinerie répliquative. La figure 2 ter-a et -b montre deux exemples de photoproduits : le 6-4 photoproduit où une thymine est liée de façon covalente à une cytosine, et le dimère de thymine (CPD) où deux de ces bases sont liées entre elles par deux liaisons covalentes. Dans ce type de lésion, la longueur des liaisons formées entre les bases adjacentes est beaucoup plus courte que la distance normale entre deux bases successives et les contraintes ainsi créées entraînent une courbure de la molécule d'ADN de 9° au niveau d'un CPD et de 44° pour un 6-4 photoproduit (Ravanat et al., 2001).

E) Les coupures physiologiques de l'ADN

En plus des lésions accidentelles pouvant survenir dans l'ADN, certains processus physiologiques des cellules eucaryotes nécessitent des coupures de la molécule d'ADN.

Les ADN topoisomérases sont des enzymes qui contrôlent la structure topologique de l'ADN en générant des coupures transitoires dans l'ADN et en catalysant le passage des segments d'ADN à travers ces coupures avant de les refermer. Ce mécanisme implique une étape où la topoisomérase est transitoirement associée de manière covalente à l'ADN. Elles permettent notamment d'ajouter ou d'enlever des supertours dans les molécules d'ADN afin de relaxer leur structure. Elles jouent aussi un rôle essentiel lors de nombreuses étapes de la vie cellulaire (réplication, transcription, séparation des chromosomes, etc.) (Lock and Ross, 1987) (Champoux, 2001). Toutes les topoisomérases identifiées utilisent un résidu tyrosine pour cliver la liaison phosphodiester de l'ADN. En fonction de leur mode de coupure, les topoisomérases ont été classées en deux groupes : les ADN topoisomérases de type I (monomériques, indépendantes de l'ATP, hormis la reverse gyrase) coupent un seul des deux brins de la double hélice d'ADN alors que les topoisomérases de type II (multimériques, dépendantes de l'ATP) réalisent une coupure des deux brins de l'ADN.

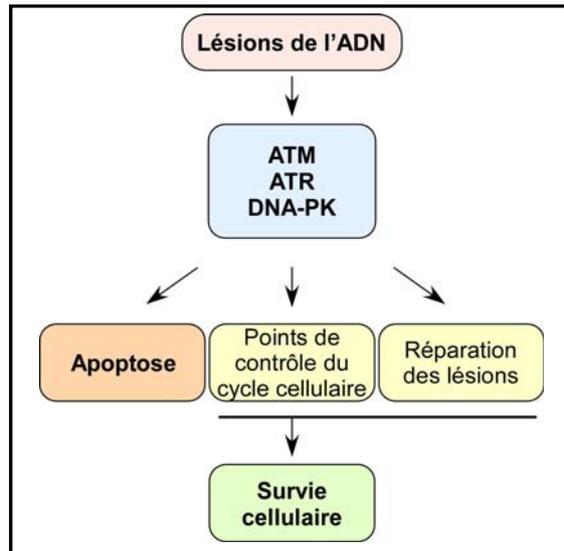
Ces enzymes sont l'objet d'une activité de recherche intense, en particulier parce qu'elles sont les cibles pharmacologiques d'importants agents anticancéreux qui bloquent le mécanisme d'action de la topoisomérase au moment où celle-ci est associée de façon covalente à l'ADN (Kreditor et al., 2005) (Martincic and Hande, 2005).

Les topoisomérases interviennent lors de la gamétogénèse, au cours de la première division de la méiose, où la recombinaison entre chromosomes homologues par « crossing-over » nécessite l'introduction de coupures double-brin dans l'ADN. La résolution de ces coupures permet une amplification de la diversité génétique des gamètes produits (Lynn et al., 2004) (Whitby, 2005).

Enfin, dans la recombinaison V(D)J et le changement de classe, phénomènes clef de la maturation du système immunitaire des mammifères, une réaction de recombinaison site-spécifique met en jeu des coupures double-brin de l'ADN puis leur résolution afin de réorganiser les gènes codant pour les immunoglobulines des lymphocytes B ou les récepteurs des lymphocytes T. Ce processus assure ainsi la grande diversité d'immunoglobulines et de récepteurs nécessaire à la reconnaissance des antigènes de notre environnement (Borghesi and Milcarek, 2006) (Lieber et al., 2006).

2. Les points de contrôle de l'intégrité du génome

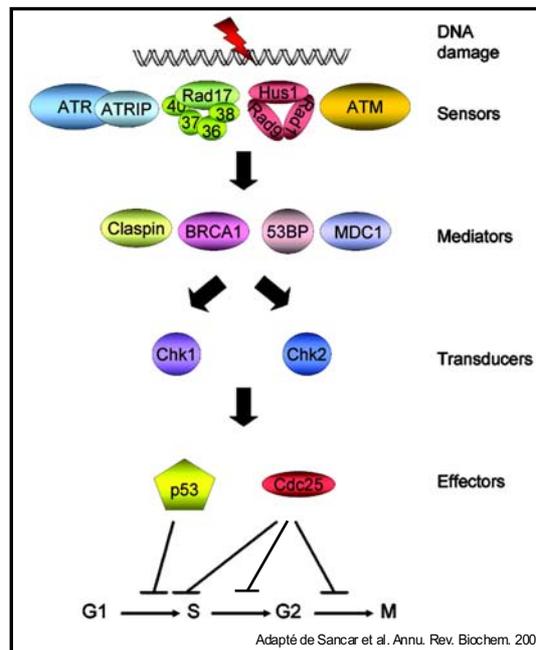
Afin d'assurer sa survie suite à un stress génotoxique, la cellule eucaryote a développé un ensemble de mécanismes visant à coordonner ou ralentir les différents processus cellulaires afin de laisser le temps aux protéines de réparation de l'ADN de réparer les lésions présentes. Dans l'impossibilité de prendre en charge correctement l'ensemble des lésions présentes, la cellule se dirigera alors vers une mort par apoptose (figure 3a). Un des points capitaux de la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN est le ralentissement ou l'arrêt momentané du cycle cellulaire. A cette fin, une série de voies de détection et de signalisation des lésions dans l'ADN, mettant en jeu les kinases ATM, ATR et DNA-PK ainsi que différents médiateurs, permet à des effecteurs spécifiques de la position de la cellule dans le cycle cellulaire d'arrêter la progression de ce dernier à la transition G1/S, au sein de la phase S, ou encore à la transition G2/M (voir figure 3b).



a) Schéma de la réponse cellulaire aux dommages dans l'ADN.

En réponse à la présence de lésions dans l'ADN dans les cellules en prolifération, les points de contrôle du cycle cellulaire sont activés.

Le cycle cellulaire est alors interrompu le temps que la cellule répare les lésions. Mais si la quantité de lésions présente est trop importante, la cellule ne peut y faire face et elle s'orientera vers un programme de mort cellulaire par apoptose.



b) Représentation schématique des voies de points de contrôle du cycle cellulaire.

Après détection de la lésion de l'ADN par des protéines spécialisées, le signal est propagé en plusieurs étapes et est transduit via Chk1 et Chk2 aux effecteurs p53 et Cdc25.

En fonction de la phase du cycle cellulaire, p53 peut être activé et/ou Cdc25 peut être inactivé afin de bloquer le cycle cellulaire en différents points de contrôle : G1/S, S, G2-M.

Figure 3 : Réponse cellulaire aux lésions de l'ADN et points de contrôle du cycle cellulaire

A) Les protéines kinases reliées aux PI3 kinases

La protéine kinase ATM est mutée dans le syndrome d'ataxie telangiectasique (une maladie génétique autosomale récessive caractérisée par des troubles neurologiques, une immunodéficience et une forte prédisposition au cancer (Shiloh, 1997)). ATM, ainsi que ATR, présentant des homologies avec ATM et Rad3, et la protéine kinase ADN dépendante DNA-PK font partie de la famille des kinases reliées aux phosphatidylinositol-3-OH kinases (PIKK). Ces PIKK sont à l'initiation des cascades de phosphorylations qui à terme entraînent la réparation de l'ADN, l'activation des points de contrôle ou l'induction de la mort cellulaire (Shiloh, 2003).

1) La kinase ATM

ATM est un détecteur de lésion activé en réponse aux cassures double-brin dans l'ADN (Banin et al., 1998). L'autophosphorylation de ATM sur sa sérine 1981 entraîne sa transition entre une forme multimérique inactive et une forme monomérique active (Bakkenist and Kastan, 2003). NBS1 (protéine impliquée dans le syndrome Nimègue) forme avec les protéines Mre11, qui possède des activités endo- et exonucléase, et Rad50, qui lie l'ATP (D'Amours and Jackson, 2002), le complexe MRN qui s'associe à ATM et permet son recrutement et son activation au site de la lésion (Lee and Paull, 2004). Le mécanisme précis aboutissant à l'autophosphorylation de ATM n'est pas encore connu, mais semble impliquer la phosphatase PP2A (Goodarzi et al., 2004). En absence de lésions dans l'ADN, ATM et PP2A sont associés et la dissociation de ce complexe en réponse aux dommages de l'ADN est suivie de l'autophosphorylation de ATM. Par ailleurs, ATM est acétylé par l'histone acétylase Tip60 et cette modification semble aussi réguler son activité (Sun et al., 2005). En réponse à son recrutement et à son activation, ATM phosphoryle un grand nombre de substrats intervenant dans les voies de point de contrôle du cycle cellulaire, afin de stopper la progression du cycle cellulaire en présence de lésions sur l'ADN, ou dans la réparation de ces lésions : NBS1 (Lim et al., 2000), BRCA1 (Xu et al., 2002), SMC1 (Kim et al., 2002), MDC1 (Goldberg et al., 2003), 53BP1 (DiTullio et al., 2002), Chk2 (McGowan, 2002), p53 (Banin et al., 1998) et H2AX (Stiff et al., 2004) (voir plus loin le rôle de ces protéines dans les

différents points de contrôle de l'intégrité du génome, ainsi que dans les voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN).

2) *La kinase ATR*

ATR a été mis en évidence sur la base de sa similarité avec ATM et Rad3 (Cimprich et al., 1996) et occupe un rôle essentiel dans la réparation des lésions de l'ADN et l'activation du point de contrôle de la réplication de l'ADN (Abraham, 2001). Ainsi, les souris déficientes pour ATR meurent dès les premiers jours de vie embryonnaire, montrant que cette protéine est essentielle à la viabilité cellulaire (Brown and Baltimore, 2000). ATR contrôle la cinétique de l'amorçage des origines de réplication (Shechter et al., 2004) et l'initiation des mécanismes mitotiques aux centrosomes par phosphorylation de Chk1 (Kramer et al., 2004). L'activité de ATR ne semble pas être stimulée par la présence de lésions dans l'ADN ou de fourches de réplication bloquées, en revanche sa localisation cellulaire est modifiée. En réponse aux dommages de l'ADN ou au blocage de la fourche de réplication, ATR s'associe à ATRIP qui lie l'ADN endommagé par les UV ou les ADN simple-brin couverts par la protéine de réplication RPA (Zou and Elledge, 2003). Ainsi ATR est retrouvé au niveau des ADN simple-brin grâce à son interaction avec ATRIP et RPA, autorisant alors la phosphorylation de ses substrats tels Rad17 (Zou et al., 2002) ou Chk1 (Guo et al., 2000).

3) *La kinase DNA-PK*

DNA-PK, membre de la famille des PIKK, est composé de trois sous-unités : la sous-unité catalytique DNA-PKcs et le dimère Ku70/Ku80 qui lie l'ADN et recrute la sous-unité catalytique au site de la lésion (Lee and Kim, 2002). DNA-PK est activée par les cassures double-brin de l'ADN, recrutée rapidement sur le site du dommage et autophosphorylée sur de nombreux sites (voir plus loin le chapitre consacré à DNA-PK dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN). Les souris déficientes pour cette kinase montrent une sensibilité accrue aux rayonnements ionisants, vieillissent prématurément, présentent des télomères raccourcis ainsi qu'un défaut de réparation des DSB par recombinaison non-homologue (Espejel et al., 2004). Les cibles principales de l'activité de DNA-PK (en dehors d'elle-même) sont des protéines des voies de signalisation cellulaire et de la réparation de

l'ADN : p53 (Achanta et al., 2001), l'hélicase de Werner (WRN) (Karmakar et al., 2002) et l'histone H2AX (Stiff et al., 2004). Son implication majeure reste néanmoins cantonnée à la réparation des lésions de l'ADN par recombinaison non-homologue.

B) Le point de contrôle G1/S

En présence de lésions dans l'ADN, le point de contrôle G1/S a pour but d'empêcher la réplication d'un ADN endommagé *via* deux voies distinctes de transduction du signal (figure 3b).

La première implique la dégradation de la phosphatase Cdc25A et induit un arrêt rapide en G1/S. Les kinases Chk2 et Chk1 activées par phosphorylation par ATM et ATR phosphorylent Cdc25A qui est alors dirigé vers la protéolyse par le protéasome dépendant de l'ubiquitine (Mailand et al., 2000). Cette dégradation de Cdc25A entraîne l'inactivation de la kinase cycline-dépendante de type 2 (Cdk2) et empêche ainsi la fixation de Cdc45 sur la chromatine (Arata et al., 2000). Cdc45 est une protéine essentielle au recrutement de l'ADN polymérase α (Pol α), polymérase chargée de la synthèse des amorces d'ARN nécessaires à l'initiation de la réplication. L'absence de Cdc45 de la chromatine empêche donc le recrutement de Pol α et le démarrage des fourches de réplication. Ce mécanisme apparaît être responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S.

Pour maintenir ce blocage plus longuement, des réponses transcriptionnelles sont induites par p53, considéré comme le gène suppresseur de tumeur le plus souvent muté dans les cancers chez l'humain (Hollstein et al., 1991) (Michael and Oren, 2002). La phosphorylation de la sérine 15 de p53 par ATM/ATR (Efeyan and Serrano, 2007) et DNA-PK (Achanta et al., 2001) et de sa sérine 20 par Chk1/Chk2 (Efeyan and Serrano, 2007) inhibe son export du noyau et sa dégradation, entraînant une accumulation de p53 dans le noyau. En temps normal l'ubiquitine-ligase Mdm2 se lie à p53 et favorise son ubiquitination et sa dégradation, aidant ainsi à maintenir un niveau constant de p53. Mais une fois activée, ATM phosphoryle Mdm2 sur sa sérine 395, entraînant la dissociation du complexe Mdm2/p53, et, là aussi, l'augmentation du niveau de p53 dans le noyau de la cellule (Maya et al., 2001). La cible clef de la régulation transcriptionnelle par p53 est p21, un inhibiteur des Cdk. L'inhibition des kinases cyclineE/Cdk2 par p21 empêche le passage entre les phases G1 et S du cycle

cellulaire. Enfin, la protéine p21 empêche aussi l'entrée en phase S par la séquestration, *via* la protéine RB, du facteur de transcription E2F responsable de l'expression de divers gènes requis pour l'entrée en phase S (Bartek and Lukas, 2001) (Lin et al., 2001).

C)Le point de contrôle intra-S

Au cours de la phase S du cycle cellulaire, la présence de lésions sur l'ADN inhibe la réplication de l'ADN grâce au point de contrôle intra-S. Celui-ci est régulé par deux voies distinctes, une voie dépendante des interactions ATM/ATR-Chk1/Chk2-Cdc25A (figure 3b) et l'autre étant liée à ATM-NBS1-SMC1 (Falck et al., 2002). En fonction du type de lésion, ATM ou ATR vont phosphoryler Chk2 ou Chk1, respectivement, entraînant la phosphorylation et la dégradation de Cdc25A (Falck et al., 2002) (Zhao et al., 2002) (Sorensen et al., 2003). Cette diminution des niveaux de Cdc25A provoque l'inactivation des protéines promotrices de la phase S cyclineE/Cdk2 et empêche la fixation de Cdc45 au niveau des origines de réplication tardives. La phosphorylation par ATM de la sérine 343 de NBS1 favorise aussi l'activation du complexe MRN et du point de contrôle intra-S (Lim et al., 2000) (Zhao et al., 2000). Selon l'état de phosphorylation de NBS1, la protéine SMC1 impliquée dans le complexe de cohésion entre chromatides sœurs va être phosphorylée par ATM au niveau des sérines 957 et 966, stimulant de la sorte le point de contrôle intra-S par un mécanisme encore peu connu (Kim et al., 2002) (Yazdi et al., 2002). L'activation de ce point de contrôle est, par ailleurs, contrôlée par des protéines médiatrices/adaptatrices telles que le partenaire de p53 53BP1 (Roche and Lowndes, 2007), la protéine associée au cancer du sein BRCA1 (Yarden and Papa, 2006) ou le médiateur des points de contrôle MDC1 (Lou et al., 2006), qui participent à la régulation de la phosphorylation des protéines Chk1, Chk2 et NBS1.

En présence de lésions induites par les UV ou d'autres lésions provoquant des déformations de la molécule d'ADN, l'avancement des fourches de réplication peut être bloqué dans un mécanisme qualifié de point de contrôle de la réplication. Ce type de dommage encombrant est détecté par le couple ATR/ATRIP (Abraham, 2001) (Yang and Zou, 2006) qui se lie à l'ADN au niveau de ces lésions, soit directement (Unsal-Kacmaz et al., 2002), soit par l'intermédiaire de la protéine RPA présente au niveau des fourches de

réplication sur les portions d'ADN simple-brin (Zou and Elledge, 2003). Cette fixation à l'ADN active ATR, qui phosphoryle Chk1 qui à son tour va phosphoryler Cdc25A, amenant cette dernière vers la voie ubiquitine/protéasome de dégradation des protéines. L'inhibition du complexe Cdk2/cyclineE-A qui en découle inhibe la fixation de Cdc45 sur l'ADN et, en conséquence, le démarrage tardif des fourches de réplication (Heffernan et al., 2002). Par ailleurs, la présence d'ADN simple-brin au cours de la phase S inhibe aussi le démarrage des fourches de réplication par un mécanisme mettant en jeu ATR, Chk1, et l'inhibition des activités kinases Cdc7/Dbf4 requises pour la fixation de Cdc45 sur la chromatine (Costanzo et al., 2003).

Ainsi les voies de signalisation initiées par ATM comme par ATR aboutissent à la phosphorylation de BRCA1 (Tibbetts et al., 2000) (Lee et al., 2000), de NBS1 et d'autres cibles permettant le redémarrage des fourches de réplication bloquées. Celles-ci sont réactivées par des mécanismes de recombinaison, tandis que, parallèlement, l'initiation de nouvelles origines de réplication est inhibée.

D)Le point de contrôle G2/M

Afin d'éviter l'entrée en mitose des cellules ayant un ADN endommagé, le point de contrôle G2/M est initié par les voies de signalisation dépendantes de ATM et ATR (figure 3b). Une fois activées, ces kinases propagent un signal en phosphorylant des protéines à domaine BRCT (BRCA1 C-terminal domain) comme BRCA1 (Yarden and Papa, 2006), 53BP1 (Wang et al., 2002) ou MDC1 (Lou et al., 2003) (Lou et al., 2006) ce qui favorise la phosphorylation de Chk1 et Chk2. La phosphorylation ultérieure de Cdc25A par Chk1/Chk2 conduit à sa dégradation par la voie ubiquitine/protéasome et entraîne l'inactivation du complexe cyclineB/Cdc2, protéines essentielles au passage G2/M, et bloque en conséquence l'entrée en mitose (Chow et al., 2003) (Boutros et al., 2006). De plus, la kinase p38 qui phosphoryle et inactive les phosphatases de la famille Cdc25 en réponse au stress environnemental (irradiation UV, choc osmotique, etc.) amplifie ce phénomène (Lemaire et al., 2006) (Cha et al., 2007).

Le maintien du blocage en G2/M est ensuite assuré par des voies dépendantes de p53. Les cibles de ce suppresseur de tumeur sont les protéines p21, GADD45 qui entraîne alors la

dissociation du complexe Cdc2/cyclineB (Vairapandi et al., 2002), et 14-3-3 σ qui séquestre les complexes Cdc2/cyclineB dans le cytoplasme (Hermeking and Benzinger, 2006). Par ailleurs p53 inhibe la transcription de Cdc2 et de la cycline B aboutissant de la sorte à une inhibition totale des mécanismes d'entrée en mitose.

E) Points de contrôle du cycle cellulaire et cancer

L'activation des points de contrôle du cycle cellulaire de manière coordonnée aux mécanismes de réparation ou d'apoptose est essentielle au maintien de l'intégrité du génome. La mutation ou la diminution de l'expression de gènes impliqués dans les points de contrôle est une caractéristique commune à une grande majorité de cancers. Ainsi la signalisation correcte des lésions de l'ADN, et l'activation des points de contrôle en découlant sont essentielles à la prévention du cancer. Des mutations de Chk1 ou Chk2 ont été retrouvées associées à des cas sporadiques ou familiaux de cancers (Bell et al., 1999). L'inhibition du point de contrôle G2/M est vraisemblablement plus critique dans les cellules cancéreuses en prolifération dépourvues de p53 que dans les cellules saines (quiescentes ou disposant de points de contrôle pleinement fonctionnels). Ainsi la recherche de nouvelles drogues visant à inhiber le point de contrôle G2/M sont à la base de nouvelles stratégies de thérapies anticancéreuses. Chk1 et Chk2 sont des cibles de choix. Une approche qui combinerait les traitements classiques (chimiothérapies, radiothérapies) et l'administration d'inhibiteurs de Chk1 et Chk2 constituerait certainement une démarche efficace pour l'élimination de cellules cancéreuses (Shimada and Nakanishi, 2006).

II. Les différentes voies de réparation de l'ADN chez les eucaryotes

1. La réparation des mésappariements de bases

La réplication de l'ADN chez les eucaryotes est globalement très fidèle, grâce à la grande précision des ADN polymérases répliquatives et à leur activité de « proofreading » leur permettant de retirer le dernier nucléotide incorporé au cas où ce dernier n'est pas le bon. Néanmoins, il arrive régulièrement qu'un nucléotide soit mal incorporé en face du brin parental ce qui donne un mésappariement (figure 1). Par ailleurs, la réplication des ADN microsatellites, qui sont des motifs de séquences répétitives, peut aussi donner lieu à la formation de boucles d'insertion/délétion (IDLs pour Insertion/Deletion Loops) localisés à l'extérieur de la double hélice. Ces structures résultent de la dissociation locale des deux brins de l'ADN, puis de leur rehybridation incorrecte, et sont réparées par le même mécanisme que les mésappariements de bases. Un défaut dans ce processus entraîne alors une augmentation de la mutabilité spontanée des cellules et une forte prédisposition au développement de tumeurs (Peltomaki, 2003).

La réparation de ces aberrations par le système de réparation des mésappariements, le MMR (MissMatch Repair), se fait selon trois étapes principales : la reconnaissance de la paire de base mésappariée, le ciblage des enzymes de réparation sur le brin fille de l'ADN portant l'information erronée, puis le processus de réparation proprement dit (voir figure 4).

A) Reconnaissance du mésappariement

Chez les eucaryotes, la reconnaissance de la zone mésappariée est effectuée par des protéines MSH, homologues de MutS chez la bactérie. Parmi les cinq MSH qui ont été identifiés dans les cellules humaines, trois participent au MMR sous forme d'hétérodimère. Ainsi le facteur de liaison aux mésappariements le plus fréquemment retrouvé est composé de MSH2 et MSH6, et est couramment désigné par le nom de MutS α . Ce dimère initie la réparation des paires de bases mésappariées ainsi que celles des IDLs d'un ou deux

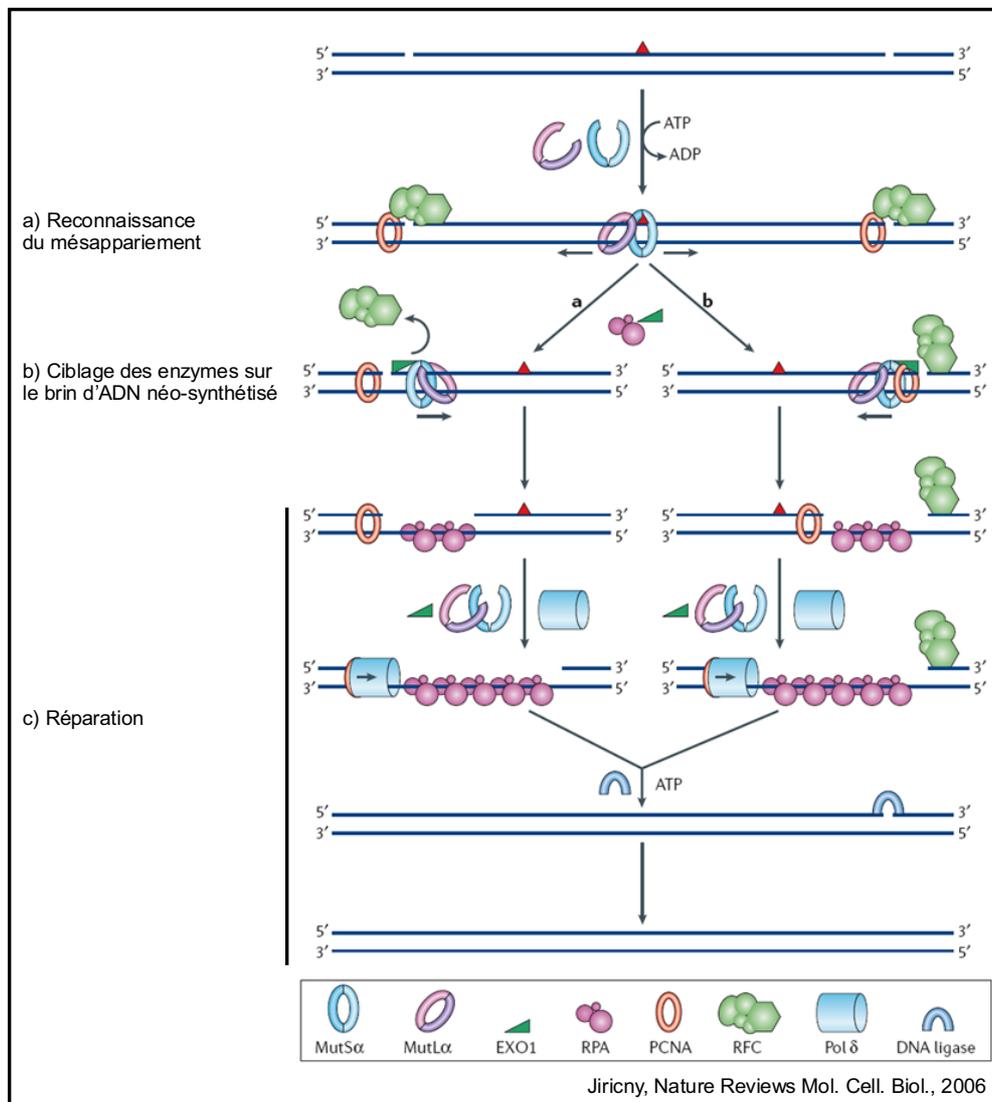


Figure 4 : Réparation des mésappariements de bases.

MutS α et MutL α se fixent au niveau de la zone du mésappariement puis migrent le long de la molécule d'ADN et s'associent à PCNA et Exo1. Après dégradation de la zone de mésappariement, la brèche ainsi ouverte est comblée par Pol δ et la molécule d'ADN est re-liguée.

Complexe	Composants	Fonctions
MutS α	MSH2, MSH6	Reconnaissance des mésappariements de bases et des petites boucles d'insertion/délétion
MutS β	MSH2, MSH3	Reconnaissance des boucles d'insertion/délétion
MutL α	MLH1, PMS2	Association à MutS α , initiation de la réparation
MutL β	MLH1, PMS1	Inconnu
MutL γ	MLH1, PMS3	Complexe de secours pour MutL α

Tableau 1 : Composition et fonctions des complexes Mut dans la réparation des mésappariements de bases chez les eucaryotes

nucléotides. La réparation des IDLs de plus grande taille est quant à elle initiée par le dimère MutS β composé de MSH2 et MSH3 (Acharya et al., 1996) (Jiricny, 2006) (tableau 1).

B) Ciblage du brin néo-synthétisé

Chez la bactérie la discrimination entre le brin néo-synthétisé et le brin parental lors de la réplication de l'ADN est possible car le brin fille est hypométhylé pendant un certain laps de temps après sa synthèse (Iyer et al., 2006). Par contre, dans la cellule eucaryote, la manière dont se fait cette reconnaissance des deux différents brins d'ADN est mal connue. L'hypothèse la plus communément admise est l'existence, sur le brin fille, de cassures simple-brin non résolues à la suite de la réplication (Thomas et al., 1991) (Iyer et al., 2006).

C) Réparation du mésappariement

Une fois sur le site du mésappariement, le complexe MutS s'associe aux protéines MLH, homologues des MutL bactériennes, permettant l'initiation de la réparation des mésappariements. Quatre protéines MLH ont été mises en évidence chez les cellules eucaryotes. Elles peuvent former trois complexes hétérodimères distincts ayant tous en commune la protéine MLH1 et présentant des activités ATPase et endonucléase (Kadyrov et al., 2006). MutL α , le dimère composé de MLH1 et PMS2, assure la majorité de l'activité MutL dans les cellules humaines. Une très forte proportion de MLH1 (90% du stock cellulaire) est impliquée dans ces complexes (Raschle et al., 1999) qui peuvent intervenir dans les réparations initiées par MutS α comme par MutS β (Edelmann et al., 2000). Les deux autres complexes MutL β (composé de MLH1 et PMS1) et MutL γ (MLH1 et MLH3) ont été identifiés dans les cellules eucaryotes, mais toutefois l'implication de MutL γ dans le processus de MMR semble faible (Cannavo et al., 2005) et celle de MutL β n'a pas encore pu être démontrée (Raschle et al., 1999).

La structure en pince coulissante de MutS associée à MutL va alors glisser le long de la molécule d'ADN jusqu'à un site de coupure sur le brin néo-synthétisé permettant de différencier celui-ci du brin parental. C'est au niveau de cette cassure que s'assemble alors le complexe de réparation (Blackwell et al., 2001). MutS et MutL s'associent alors à l'anneau de

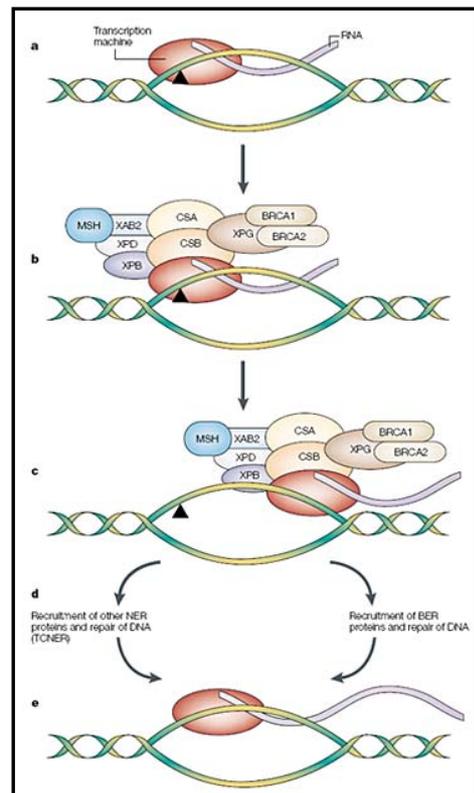
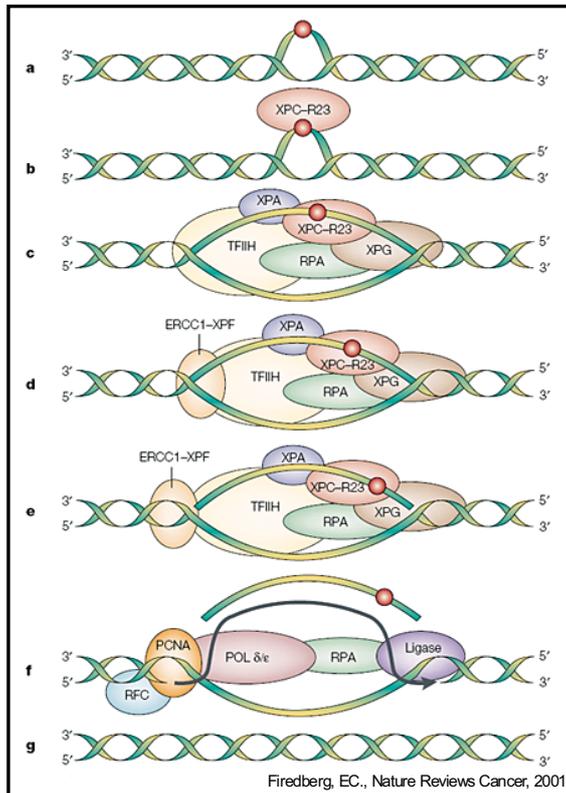
processivité PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, un complexe homotrimérique associé à certaines ADN polymérase) et à l'exonucléase 1 (Exo1). Cette dernière va dégrader le brin d'ADN comportant l'information erronée en partant de la coupure simple-brin. La portion d'ADN parental simple-brin ainsi dégagée est recouverte par RPA, protégeant la molécule des attaques d'endonucléases. Les protéines MutS, MutL et Exo1 se dissocient ensuite de l'ADN, pour permettre à l'ADN polymérase δ (Pol δ) d'assurer le remplissage de la brèche résultant de l'action de l'exonucléase. L'étape ultime de la réparation est la ligation par l'ADN ligase I au niveau de la jonction entre le fragment d'ADN synthétisé lors du MMR et le reste de la molécule issue de la réplication, sur le brin néo-synthétisé (Jun et al., 2006).

2. La réparation par excision de nucléotide

Le rayonnement ultraviolet (UV-B) émanant du spectre solaire est un des agents génotoxiques les plus abondants dans notre environnement. Il peut entraîner l'apparition de photoproduits distordant la double hélice d'ADN, comme les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPD) ou les photoproduits 6-4 (6-4PP) (Leibeling et al., 2006). Ces lésions sont prises en charge par un mécanisme spécifique : la réparation par excision de nucléotide (NER) (figure 1 et figure 5a et 5b).

A) Le mécanisme du NER

La voie de réparation par excision de nucléotide met en jeu plus d'une vingtaine de protéines différentes. On distingue deux modes de fonctionnement différents : la réparation globale du génome (GGR pour Global Genome Repair, présentée figure 5a) et la réparation au cours de la transcription de l'ADN (TCR pour Transcription Coupled Repair, présentée figure 5b). Ces deux voies diffèrent essentiellement par leur mode reconnaissance de la lésion, mais s'organisent toutes deux en cinq étapes majeures. Dans le GGR, cette reconnaissance de la lésion dépend des protéines de la famille XP. Cette famille regroupe sept membres XPA à XPG et tient son nom du syndrome xeroderma pigmentosum provoqué par la mutation de ces facteurs. Dans le cas de la TCR, ce sont les protéines du syndrome de cockayne (CSA et CSB) qui sont impliquées dans cette détection des lésions. Chez l'homme, l'absence de protéines



a)

b)

Figure 5 : Réparation par excision de nucléotide (NER).

a) Réparation globale du génome (GGR) : Le complexe XPC/R23 détecte la lésion et recrute les facteurs RPA, TFIIH et XPA qui ouvrent localement l'hélice d'ADN. Les endonucléase XPG et XPF/ERCC1 excisent ensuite le brin endommagé qui sera resynthétisé par Pol δ/ϵ .

b) Réparation couplée à la transcription (TCR) : L'ARN polymérase II bloquée par une lésion de type CPD s'associe aux facteurs CSA et CSB qui vont recruter les protéines du NER.

impliquées dans le NER entraîne différents syndromes, caractérisés principalement par des désordres neurocutanés (description ci-après), liés à des perturbations des différentes étapes du NER.

1) La reconnaissance de la lésion

XPC est l'initiateur de ce processus, sous forme d'un complexe hétérotrimère avec HHR23B et la centrine 2. Il agit comme un détecteur de la lésion sur l'ADN, et recrute les effecteurs suivants au site du dommage (Emmert et al., 2000) (Khan et al., 2006). XPA se fixe aussi de manière précoce à l'ADN, vérifiant la présence du dommage et aidant au recrutement des facteurs de réparation. XPE, associé à DDB2 semble être spécifiquement impliqué dans la reconnaissance des photoproduits induits par les UV, cette protéine présentant une forte affinité pour ce type de structures (Keeney et al., 1993) (Kulaksiz et al., 2005) (figure 5a). Dans le cas de la TCR, l'ARN polymérase II (RNA pol II) bloquée par la présence d'un CPD sur le brin transcrit va recruter les protéines CSA et CSB (CSA, B pour Cockayne Syndrome protein A, B) qui vont à leur tour recruter les effecteurs suivants (Licht et al., 2003) (cf. figure 5b).

2) La délimitation de la lésion

Suite à la reconnaissance du dommage, la structure de la double hélice d'ADN doit être ouverte autour du site de la lésion. Pour cela RPA et le facteur de transcription TFIIH sont recrutés sur la chromatine. RPA s'associe à XPA, stabilisant la structure en « bulle » ouverte de l'ADN autour de la lésion. TFIIH est un grand complexe protéique d'au moins 10 sous-unités, parmi lesquelles on trouve XPB et XPD. Ces deux protéines possèdent respectivement une activité hélicase 3' → 5' et 5' → 3' (Gerard et al., 1991). Une autre sous-unité de TFIIH, TTD-A, régule le complexe et stimule l'activité ATP-ase de XPB, aidant ainsi à l'ouverture de l'hélice d'ADN (Coin et al., 2006).

3) Incision du brin d'ADN portant la lésion

Afin d'éliminer l'oligonucléotide portant la lésion, les deux endonucléases XPG et XPF incisent l'ADN autour du site de dommage dans un ordre précis. Premièrement, XPG incise la molécule d'ADN 5 à 6 nucléotides en 3' de la lésion. Ensuite XPF, secondé par ERCC1, pratique la deuxième incision 20 à 22 nucléotides en 5' du dommage. Le positionnement précis de XPG sur le brin d'ADN endommagé est probablement permis grâce à son interaction directe avec TFIIF et RPA (Emmert et al., 2001) (Emmert et al., 2002).

4) Elimination de l'oligonucléotide contenant la lésion

Le processus décrit ci-dessus aboutit de manière constante à l'élimination d'un oligonucléotide d'une taille de 27 à 29 nucléotides. Le devenir de cette molécule n'est pas encore bien connu, soit elle est dégradée instantanément après son transport vers le cytoplasme, soit elle peut contribuer au déclenchement de mécanisme de protection cellulaire contre les rayonnements ultra-violets. En effet il a été montré que de petits ADN de séquence particulière sont capables d'induire des mécanismes de réparation de l'ADN ou la mélanogenèse (Hadshiew et al., 2002).

5) Synthèse d'ADN, remplissage de la brèche

Une fois l'oligonucléotide contenant la lésion éliminé, la brèche créée doit être comblée. Les ADN polymérase δ et ϵ interviennent dans la synthèse de cette nouvelle portion d'ADN, utilisant le brin non endommagé comme matrice. Finalement, la cassure simple-brin restant à l'extrémité 3' de la portion d'ADN fraîchement synthétisée est liguée par l'ADN ligase I, marquant la fin du processus de réparation par excision de base (Emmert et al., 2006).

B) Les pathologies liées à un défaut du NER

Il existe chez l'homme trois types de maladies autosomales récessives rares associées à des dysfonctionnements du NER caractérisées par des prédispositions aux cancers, mais aussi par des désordres neurologiques et cutanés sévères.

1) Xeroderma pigmentosum

Xeroderma pigmentosum (XP) est sans doute la pathologie associée à un défaut de NER la mieux connue. C'est de cette maladie que sont atteints les « enfants de la lune » présentant une hypersensibilité aux UV et une espérance de vie limitée. Le premier cas de patient présentant une peau sèche et hyperpigmentée a été décrit en 1863 par Moritz Kaposi qui nomma en 1874 la maladie de son nom actuel (Leibeling et al., 2006).

XP est une maladie autosomale récessive héréditaire rare retrouvée dans le monde entier. Elle est liée à la présence de mutations sur les gènes de la famille XP impliqués dans le NER. Il existe sept groupes de complémentation, reliés aux sept protéines XPA à XPG, dont les symptômes sont très proches. De plus, une forme variante de ce syndrome, appelée XPV est associée à une mutation de l'ADN polymérase η impliquée dans la synthèse translésionnelle et non à un défaut de NER mais implique les mêmes symptômes que XP (Leibeling et al., 2006). La fréquence d'apparition du syndrome XP en Europe est de l'ordre de un pour un million et l'âge moyen d'apparition des premiers symptômes varie entre un et deux ans (Kraemer et al., 1987). Ces symptômes sont initialement une forte sensibilité aux rayonnements UV avec l'apparition de graves coups de soleil guérissant lentement, dès que le patient s'expose à la lumière du jour même faible ou à travers une fenêtre. Par la suite, la peau des patients présente une hyperpigmentation et un grand nombre de taches de rousseur au niveau des zones exposées à la lumière. Assez rapidement, à un âge moyen de huit ans, les patients développent leurs premières tumeurs cutanées (mélanome, carcinome). Par ailleurs, la mutation des gènes XP entraînant un défaut de NER dans toutes les cellules, on observe aussi une atteinte progressive des yeux des patients (photophobie, conjonctivite). Enfin, dans vingt pour cent des cas, des troubles neurologiques peuvent subvenir, avec une dégénérescence neuronale probablement due à une accumulation de dommages oxydatifs dont une fraction est normalement réparée *via* le mécanisme de NER (Reardon et al., 1997). L'espérance de vie moyenne des malades est de 35 à 40 ans (Kraemer et al., 1987).

2) *Le syndrome de Cockayne*

Ce syndrome fut décrit pour la première fois en 1936 par Edward Alfred Cockayne qui le décrivit comme associé à un nanisme avec maigreur, perte des cheveux et atrophie rétinienne. Le syndrome de Cockayne (CS) est une maladie autosomale récessive héréditaire très rare, résultant de mutations sur les gènes de la famille CS (CSA ou CSB), qui a en commun avec XP l'hypersensibilité de la peau aux rayonnements solaires. En revanche les patients atteints de CS ne présentent pas de susceptibilité accrue au développement de cancers de la peau (Leibeling et al., 2006). Les principaux symptômes, outre cette sensibilité cutanée aux UV, sont nombreux et variés : retard de croissance, retard mental, troubles neurologiques et psychomoteurs, troubles de la vue, surdité, caries dentaires ainsi que faciès caractéristique avec un visage maigre et un nez crochu (de Boer and Hoeijmakers, 2000). Les troubles neurologiques, contrairement à ceux observés chez les patients XP, sont dus à une démyélinisation des neurones.

Les cellules de patients CS présentent un défaut de réparation des lésions liées aux UV, une hypermutabilité génomique, ainsi qu'une instabilité chromosomique après irradiation par des UV (Lehmann and Norris, 1989) (Mallery et al., 1998). Mais contrairement aux patients atteints de XP, ceux atteints de CS ne sont pas prédisposés à développer des cancers. Cette particularité est liée au fait que le défaut de TCR résultant des mutations de CSA ou CSB entraîne un blocage de la transcription de l'ADN par l'ARN polymérase II au niveau des lésions, et induit en conséquence l'apoptose des cellules par des voies dépendantes et indépendantes de p53 (Andressoo et al., 2006) (Laine and Egly, 2006).

3) *La trichothiodystrophie*

La trichothiodystrophie (TTD) est le troisième type de pathologie associé à un défaut de NER. Celle-ci est le résultat de mutations du gène codant pour la protéine TTD-A. Au même titre que XP ou CS, il s'agit d'une maladie autosomale récessive héréditaire rare. Le terme de trichothiodystrophie a été introduit en 1979 par Vera Price d'après un des symptômes principaux de la maladie (Leibeling et al., 2006). En effet, les patients atteints de TTD ont un faible taux de soufre au niveau de la matrice capillaire, ce qui entraîne un appauvrissement en acides aminés tels que la cystéine, la proline, la sérine ou la thréonine ayant pour

conséquence des cheveux courts, cassants et rares (de Boer and Hoeijmakers, 2000). La TTD, comme les autres maladies liées à un défaut de NER, entraîne une photosensibilité accrue, mais pas de prédisposition aux cancers de la peau, pour les mêmes raisons que chez les patients atteints de CS (Andressoo et al., 2006). Des troubles neurologiques ou psychomoteurs sont aussi fréquemment associés à cette maladie (de Boer and Hoeijmakers, 2000).

3. La réparation des cassures double-brin de l'ADN

Les cassures double-brin (DSBs) sont une forme de lésion de l'ADN particulièrement toxique pour la cellule. Elles peuvent résulter soit de l'action de rayonnements ionisants, soit de drogues radiomimétiques utilisées en thérapie anticancéreuse, ou de processus physiologiques de la cellule (activité endonucléase ou topoisomérase par exemple). Elles peuvent aussi résulter de la rencontre entre la machinerie répliquative et une cassure simple-brin non réparée au cours de la réplication (Kuzminov, 2001b) (Strumberg et al., 2000). Ces interruptions des deux brins de la molécule d'ADN (voir figure 1) ont des conséquences potentiellement dramatiques pour la cellule : fragmentation des chromosomes, translocations, et autres aberrations chromosomiques pouvant entraîner la mort cellulaire (Pfeiffer et al., 2000). Chez les eucaryotes supérieurs, l'inactivation d'un seul gène essentiel par une unique cassure double-brin non réparée peut suffire à entraîner la mort de la cellule par apoptose (Rich et al., 2000).

Deux voies de réparation sont en compétition pour la prise en charge des cassures double-brin : la recombinaison homologue (RH) et la recombinaison non homologue (NHEJ). Chez les eucaryotes inférieurs comme la levure, le mécanisme de RH est prédominant, alors que le NHEJ est le mode de réparation préférentiel des cassures double-brin chez les mammifères (Haber, 2000). Le choix du mécanisme de réparation d'une cassure double-brin est partiellement dépendant du cycle cellulaire. En effet la présence d'une chromatide sœur appariée est nécessaire à la recherche d'homologie dans le RH, ce qui limite l'utilisation de cette voie de réparation aux seules phases S tardive et G2/M du cycle (Johnson and Jasin, 2000). En revanche, le NHEJ est indépendant des homologies de séquence et est majoritairement utilisé au cours des phases G0/G1 et S précoce du cycle cellulaire

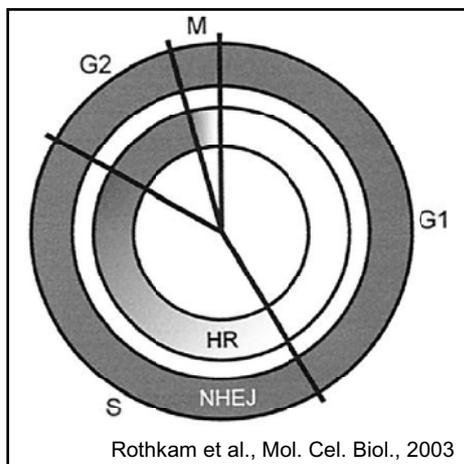


Figure 6 a): Réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue (RH) et par recombinaison non homologue (NHEJ) en fonction des phases du cycle cellulaire. Le NHEJ est utilisé par la cellule tout au long du cycle cellulaire alors que la RH n'est possible qu'au cours des phases S et G2 du cycle.

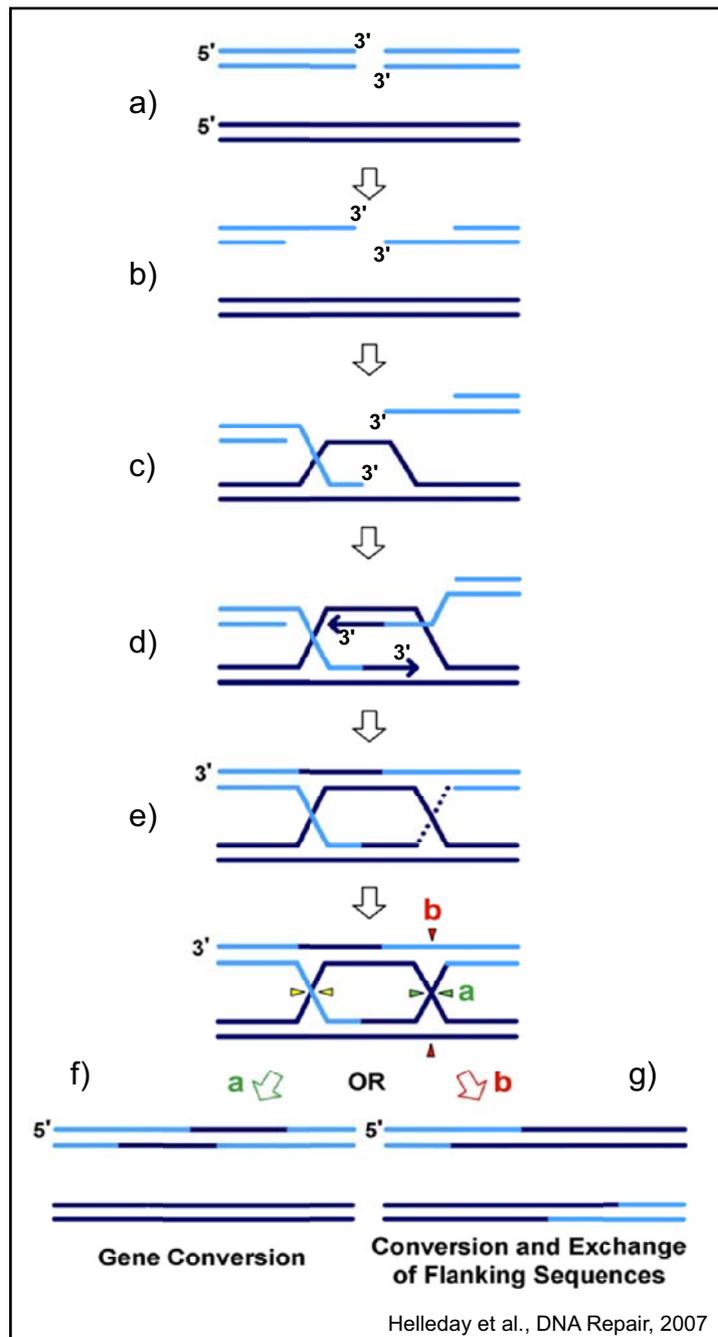


Figure 6 b): La réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue. Les extrémités de la cassure double brin (a) sont partiellement digérées (b) puis la chromatide endommagée envahit la chromatide soeur intacte par recherche d'homologie(c). La synthèse d'ADN utilise alors la chromatide intacte comme modèle pour réparer la chromatide endommagée (d) aboutissant au final à la formation d'une double jonction de Holliday (e). La résolution de ces jonctions peut alors se faire par conversion génique simple (f), ou par crossing-over (g).

(Takata et al., 1998). Néanmoins, Rothkamm et al. ont montré que des lignées cellulaires déficientes en NHEJ sont particulièrement sensibles aux irradiations quelque soit la phase du cycle cellulaire, suggérant l'importance du NHEJ tout au long du cycle cellulaire (Rothkamm et al., 2003) (cf. figure 6a).

A) La recombinaison homologue

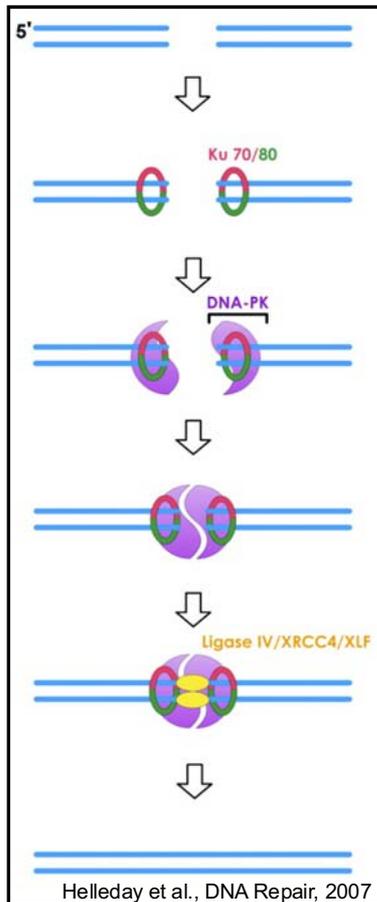
La recombinaison homologue (RH) assure une réparation fidèle de la cassure double brin en utilisant la molécule d'ADN homologue non-endommagée comme modèle pour l'incorporation de nucléotides au-delà de la cassure (figure 6b). Il existe différents sous-types de recombinaison homologue mais seule la voie classique dite de la « double jonction de Holliday » sera détaillée ici. La première étape de cette voie de réparation, est la prise en charge des extrémités de la cassure double-brin par le complexe protéique MRE11 – Rad50 – NBS1 (MRN). Ce complexe hétérotrimérique va catalyser une digestion partielle des deux extrémités 5' de la cassure afin de générer deux extrémités 3' sortantes nécessaires aux étapes suivantes de la recombinaison. Ces extrémités d'ADN simple-brin 3' sortantes sont alors recouvertes par la Protéine de Réplication A (RPA) qui a une forte affinité pour les ADN simple-brin et les stabilise. RPA sera ensuite remplacée par des protéines permettant l'échange des brins d'ADN : Rad51 ou ses paralogues. Les filaments nucléoprotéiques ainsi formés avec l'aide de protéines annexes comme Rad52, BRCA1 ou BRCA2 (BRCA1 et 2). Les filaments nucléoprotéiques ainsi formés vont alors rentrer en contact avec les brins d'ADN intacts de la chromatide appariée, et effectuer une recherche d'homologie de séquence. Cette invasion de la chromatide intacte par les deux brins de la chromatide endommagée forme alors une double jonction de Holliday. Les extrémités ainsi appariées sont alors élonguées par une polymérase qui utilise le brin intact comme matrice. Une fois la synthèse d'ADN terminée, les extrémités franches sont liguées et les jonctions de Holliday sont résolues grâce à l'action d'endonucléases reconnaissant ces structures spécifiques (Brugmans et al., 2007). Selon l'axe de coupure des jonctions de Holliday deux types de molécules recombinantes peuvent être obtenues : celles présentant une conversion génique simple ou celles présentant une conversion génique accompagnée d'un échange de fragment chromosomique, des crossing-over (Helleday et al., 2007).

La RH est donc un mécanisme de réparation fidèle, car il n'occasionne généralement pas de perte d'information génétique. Toutefois ce mécanisme peut parfois s'avérer moins précis lorsque la cassure double-brin se situe dans une région du génome présentant des séquences hautement répétitives. La recherche d'homologie et la recombinaison qui s'en suit peuvent alors entraîner une translocation, remaniement majeur de l'organisation du chromosome qui peut se révéler néfaste pour la cellule. Dans la maladie de la Leucémie Aigüe Lymphoblastique 1, on observe une prolifération maligne de cellules lymphoïdes bloquées à un stade précoce de différenciation qui est la conséquence d'une recombinaison erratique entre le gène ALL1 et de nombreux gènes partenaires situés sur différents chromosomes (Schichman et al., 1995).

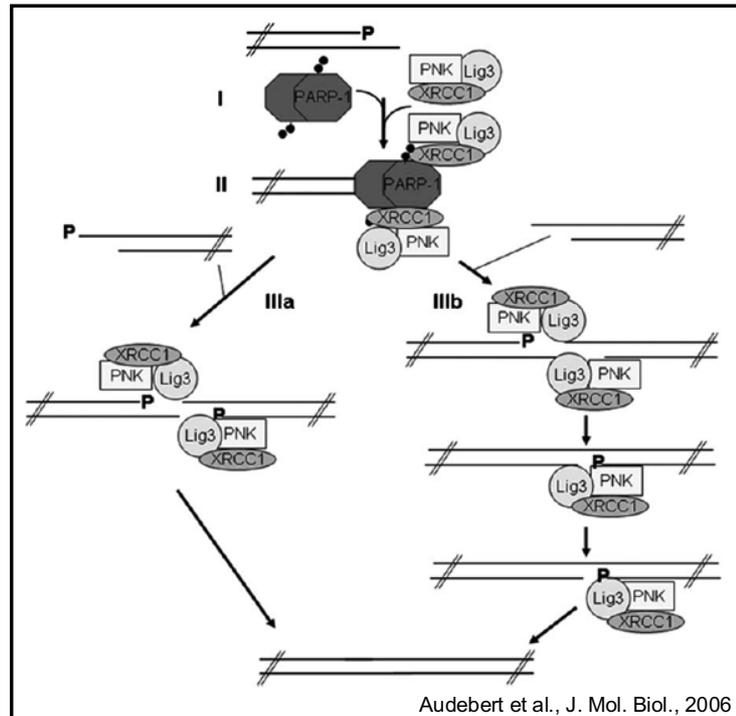
Le génome des eucaryotes supérieurs présente une forte proportion de séquences répétitives (jusqu'à 40% chez l'Homme), et la cellule eucaryote ne dispose de chromatides sœurs appariées autorisant la réparation d'une lésion par recombinaison qu'après la réplication de son matériel génétique, ce qui interdit l'utilisation d'un tel mécanisme dans les cellules quiescentes. L'existence d'un autre type de réparation des cassures double-brin de l'ADN est donc une nécessité.

B) La recombinaison non homologue

La recombinaison non homologue (NHEJ) est le mécanisme le plus simple pour réparer les cassures double-brin de l'ADN. De manière schématique, ce mécanisme relie directement les deux extrémités de la lésion, et ce, quelles que soient leur séquences (Weterings and van Gent, 2004). Cette réparation est indépendante de la présence d'homologies de séquences, néanmoins la présence de petites séquences de un à six nucléotides homologues sur les deux extrémités peut faciliter le processus. C'est le mécanisme majeur de réparation des cassures double-brin chez les eucaryotes supérieurs, qui est principalement mis en œuvre au cours des phases G1 et S précoce du cycle cellulaire. Il est aussi mis en jeu au cours de la recombinaison V(D)J nécessaire à la maturation du système immunitaire. Ainsi, un défaut dans le NHEJ peut entraîner une immunodéficiência sévère, comme celle observée chez les souris portant des mutations entraînant le phénotype SCID (Severe Combined Immune Deficiency). La réparation catalysée au cours du NHEJ est globalement fidèle lorsqu'elle



a)



b)

Figure 7 : Réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison non-homologue (NHEJ).

a) Voie classique du NHEJ dépendant de DNA-PK (D-NHEJ) : La cassure double brin est reconnue par le dimère Ku70/Ku80 qui recrute ensuite la sous unité catalytique DNA-PKcs. Après dimérisation et autophosphorylation cette dernière recrute les facteurs nécessaires au traitement des extrémités de la cassure et à sa ligation finale.

b) Voie de secours du NHEJ indépendant de DNA-PK (B-NHEJ) : en absence de DNA-PK, PARP-1 traditionnellement impliquée dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN peut reconnaître les cassures double-brin. Elle recrute alors les facteurs XRCC1, PNK responsable du traitement des extrémités de la lésion et Lig III qui catalyse la ligation des extrémités de la cassure.

s'applique à des lésions simples présentant des extrémités franches (van Heemst et al., 2004). Sur des lésions plus complexes, telles les cassures double-brin résultant de dommages multiples, le traitement des extrémités préalable à leur religation aboutit souvent à des délétions.

1) Le mécanisme de base du NHEJ

La première étape de la recombinaison non-homologue est la détection des extrémités de la cassure par deux sous-unités du complexe Protéine Kinase ADN-dépendante (DNA-PK), Ku70 et Ku80 (Reeves and Sthoeger, 1989) (Jeggo et al., 1992) qui forment un hétérodimère protégeant les extrémités de la lésion contre les activités exonucléases (voir figure 7a). Après la liaison au site du dommage, le dimère Ku s'associe à la sous-unité catalytique DNA-PKcs (Hartley et al., 1995), formant ainsi l'holoenzyme active DNA-PK (Smith and Jackson, 1999). Ensuite, si nécessaire, les extrémités de la lésion sont traitées par différentes protéines ou complexes protéiques afin de les rendre compatibles pour la ligation ultérieure. Ce traitement met notamment en jeu le complexe MRN (Nelms et al., 1998) qui présente des activités exonucléase, endonucléase et hélicase (Paull and Gellert, 1999) (Trujillo et al., 1998). Ce complexe participe par ailleurs au maintien du bon alignement des extrémités de la lésion (Huang and Dynan, 2002). La protéine Artémis s'associe à DNA-PKcs, et est activée après phosphorylation par cette dernière. Elle acquiert alors une activité endonucléase qui lui permet de dégrader les structures d'ADN en épingle à cheveux (Schlissel, 2002), étape essentielle de la recombinaison V(D)J notamment (Ma et al., 2002). Enfin, la Polynucléotide Kinase (PNK) peut assurer le nettoyage des extrémités 5'-OH et 3'-phosphate des cassures induites par les radiations grâce à ses activités 5'-kinase et 3'-phosphatase (Karimi-Busheri et al., 1999). Une fois ce nettoyage effectué, les deux extrémités sont mises bout à bout, et une série d'autophosphorylations en cis et en trans de DNA-PKcs a lieu, ce qui inhibe d'une part son activité, et réduit d'autre part son affinité pour l'ADN (Weterings et al., 2003) (Meek et al., 2007). Les étapes finales de traitement de l'ADN endommagé sont alors possibles, grâce à l'association d'un complexe formé par XLF (XRCC4-Like Factor, aussi appelé Cernunnos), XRCC4 et l'ADN-ligase IV (LigIV), chargé de relier ensemble les deux extrémités de la coupure (Ahnesorg et al., 2006) (voir ci-dessous, une explication plus détaillée de ces points).

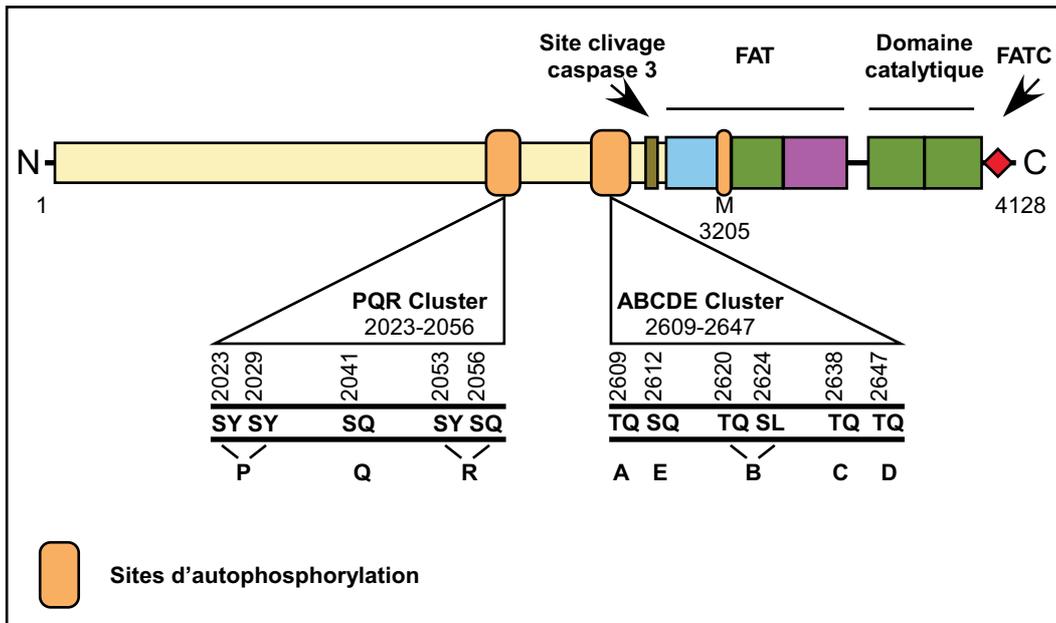
2) *La sous-unité catalytique de DNA-PK*

a) Les rôles multiples de DNA-PKcs

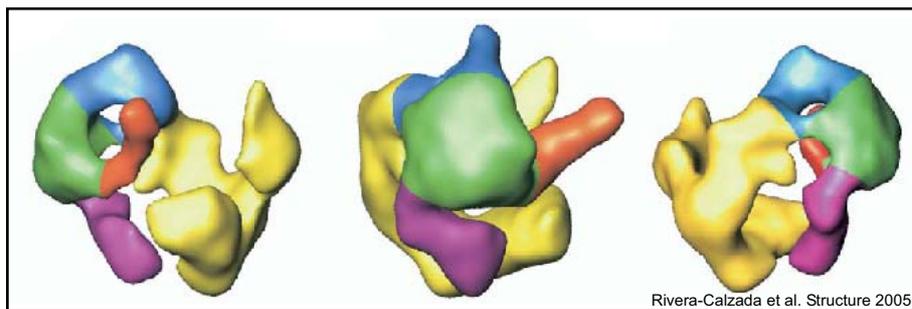
DNA-PKcs est une protéine de 460 kDa qui, associée au dimère Ku70/Ku80, forme l'holoenzyme DNA-PK. Ce complexe protéique est à la base de la détection des lésions double-brin de l'ADN, première étape du mécanisme de réparation par recombinaison non-homologue (Jackson, 2002) (figure 7a). DNA-PKcs est recrutée au site de cassure double-brin par l'hétérodimère Ku70/Ku80. Elle peut aussi interagir directement avec l'ADN, et cette fixation induit une stimulation de son activité kinase (Merkle et al., 2002) sur elle-même, ainsi que sur d'autres protéines du NHEJ ou de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN (voir plus haut). En plus de son activité catalytique, cette enzyme a aussi un rôle structural. Elle participe à la stabilisation et au maintien des deux extrémités de la molécule d'ADN au site de la cassure grâce à ses facultés d'homodimérisation (DeFazio et al., 2002). En outre, elle agit comme une plateforme de recrutement pour différents facteurs du NHEJ tels Artemis (Ma et al., 2002) ou le complexe XRCC4/ADN-ligase IV (Calsou et al., 2003). Son rôle central dans le mécanisme de recombinaison non-homologue fait de DNA-PKcs une enzyme essentielle pour la cellule et l'organisme. Ainsi, certaines souris portant une mutation non-sens sur le gène encodant DNA-PK présentent un défaut de NHEJ entraînant un phénotype d'immunodéficience « SCID » (Severe Combined Immune Deficiency) (Beamish et al., 2000). DNA-PKcs semble enfin être impliquée dans la régulation du choix de la voie de réparation des cassures double-brin de l'ADN. En effet, la présence de variants d'épissage alternatif de cette protéine dans les cellules quiescentes inhibe la voie de recombinaison homologue. Cela interdit donc le recours à ce mécanisme de réparation dans les cellules ne se divisant pas et ne disposant pas de chromatides sœurs appariées capables de fournir un modèle de qualité (Convery et al., 2005).

b) Séquence et structure de DNA-PKcs

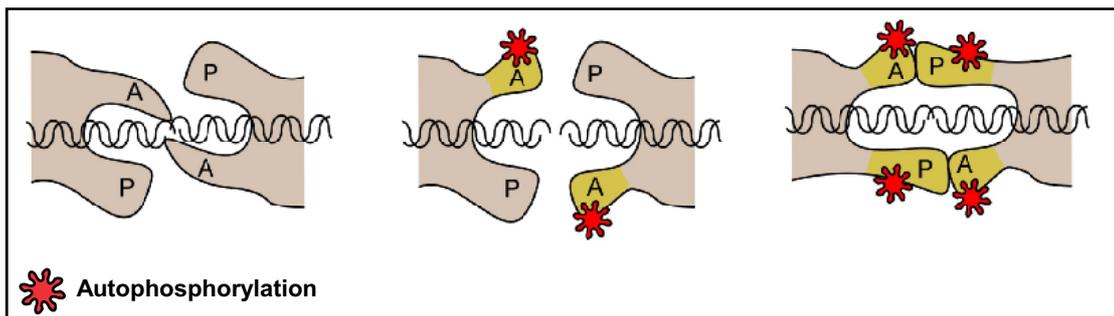
DNA-PKcs est une sérine/thréonine kinase de la famille des protéines kinases reliées aux phosphatidylinositol-3-OH kinases (PIKK), au même titre que d'autres protéines impliquées dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN : ATM et ATR (Shiloh, 2003). Les



a) Schéma de l'organisation modulaire de DNA-PKcs et position des sites d'autophosphorylation



b) Représentation tridimensionnelle de DNA-PKcs
Les différents domaines sont colorés sur le modèle de la figure a)



c) Modèle de la régulation du mécanisme de NHEJ par l'autophosphorylation des différents sites de DNA-PKcs
("A" désigne les sites ABCDE, "P" désigne les sites PQR)

Figure 8 : Organisation, structure et fonctionnement de DNA-PKcs

membres de cette famille sont tous des protéines de grande taille, ne présentant toutefois que peu d'homologies de séquence entre elles. Les seules régions présentant des homologies sont le domaine FAT (mis en évidence à l'origine dans les protéines FRAP, ATM et TRRAP) (Bosotti et al., 2000), immédiatement en amont du domaine catalytique, ainsi que celui-ci (figure 8a et b). Le domaine catalytique de DNA-PKcs est par ailleurs partiellement homologue à celui d'une PI3-kinase classique, la PI3K γ , seule PI3-kinase dont la structure est connue. Une étude par microscopie cryo-électronique de la structure de DNA-PKcs a montré l'existence de deux segments supplémentaires dans le domaine catalytique des PIKK qui font leur spécificité par rapport aux PI3-kinases classiques. Le premier est une insertion d'environ 50 résidus entre les deux lobes du domaine catalytique et le deuxième est une extension d'une centaine d'acides aminés à l'extrémité C-terminale de ce domaine catalytique : le domaine FATC (Rivera-Calzada et al., 2005) (figure 8a et b). Ce dernier domaine est très important pour l'activité de DNA-PKcs. Sa disparition entraîne une très forte baisse de l'activité kinase, de l'ordre de deux magnitudes, résultant en une déficience grave du mécanisme de NHEJ (Beamish et al., 2000).

c) Les cibles de DNA-PKcs

Un des aspects marquants de l'activité de DNA-PKcs est la grande diversité de ses cibles.

Elle peut ainsi phosphoryler certains de ses partenaires de la voie de réparation des cassures double-brin par recombinaison non-homologue tels Artemis ou XRCC4, stimulant en conséquence le traitement et la ligation des extrémités de la cassure (Ma et al., 2002) (Yu et al., 2003b). DNA-PKcs présente aussi la faculté de s'autophosphoryler au cours du processus de NHEJ. Deux domaines cibles pour cette réaction ont été identifiés : le domaine PQR présentant cinq sites d'autophosphorylation, et le domaine ABCDE présentant six sites (cf. figure 8a). La phosphorylation de ces deux domaines permet de contrôler l'accessibilité du site de coupure pour les autres facteurs de réparation, ce mécanisme est présenté figure 8c. Dans la configuration non-phosphorylée de DNA-PKcs, le domaine ABCDE verrouille les extrémités de la lésion, maintenant une certaine cohésion entre celles-ci. La phosphorylation du domaine ABCDE entraîne alors un changement conformationnel de ce dernier et ouvre l'accès au site du dommage, permettant l'alignement précis des deux extrémités de la molécule d'ADN ainsi que l'arrivée des facteurs responsables du traitement des extrémités.

Enfin la phosphorylation du domaine PQR entraîne un blocage partiel des bouts de la cassure pour les enzymes de traitement des extrémités, mais permet et stimule l'interaction avec le complexe XLF/XRCC4/ADN-LigaseIV responsable des étapes finales de la réparation (Ding et al., 2003) (Cui et al., 2005) (Ahnesorg et al., 2006).

DNA-PKcs peut aussi phosphoryler différents facteurs de la signalisation et de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN comme la Poly (ADP-Ribose) Polymérase 1 (PARP-1), ce qui inhibe son activité (Ariumi et al., 1999), la Protéine de Réplication A (RPA), pouvant ainsi participer à la signalisation des dommages de l'ADN (Brush et al., 1994), ou encore les histones H2AX (Park et al., 2003) et H1. L'histone H2AX peut être phosphorylé par les PIKK ATM et DNA-PKcs en réponse à la présence de cassures double-brin de l'ADN, ainsi que par ATR en réponse à un blocage de la réplication. Cette histone phosphorylée au niveau de la sérine 139, nommé γ H2AX, s'accumule autour des sites de cassure double-brin, formant des foyers γ H2AX qui participent d'une part à la signalisation du dommage de l'ADN, et d'autre part au maintien d'une certaine cohésion entre les extrémités de la molécule d'ADN endommagée. La phosphorylation de l'histone H1 par DNA-PKcs est essentielle au bon déroulement du processus de NHEJ. En effet, l'histone H1 qualifié de « linker histone » verrouille la structure du nucléosome et donc la plasticité de la chromatine. Cette phosphorylation diminue alors l'affinité de H1 pour l'ADN, permettant au nucléosome de glisser librement le long de la molécule d'ADN. Cela autorise, dans le même temps, la translocation du dimère Ku des extrémités de la coupure vers "l'intérieur" de la molécule d'ADN double brin. Cette translocation est nécessaire aux étapes suivantes du NHEJ (Kysela et al., 2005).

En réponse aux dommages de l'ADN, DNA-PKcs peut enfin phosphoryler p53, induisant la stabilisation et la transactivation de ce facteur de transcription, guidant la cellule vers un arrêt du cycle cellulaire ou vers la mort cellulaire par apoptose (Shieh et al., 1997).

3) Les voies alternatives de recombinaison non homologue

La présence de DNA-PKcs ou de Ku semble être, dans certains cas, facultative pour la religation *in vitro* d'un plasmide d'ADN double-brin linéarisé par une enzyme de restriction. Des extraits de cellules déficientes en DNA-PKcs, ou des extraits cellulaires épuisés en Ku

par déplétion sont aussi compétents pour ce type de réaction que des extraits de cellules sauvages (Wang et al., 2003a). De manière similaire, des extraits de cellules déficientes pour l'ADN-ligase IV conservent une forte capacité à recirculariser *in vivo* par NHEJ un plasmide linéaire (Wang et al., 2005). Ces études *in vitro* et *in vivo* montrent que d'autres voies de réparation des cassures double-brin par NHEJ, indépendantes du complexe DNA-PK/XRCC4/ADN-ligase IV, existent. Ces mécanismes alternatifs sont qualifiés de « backup NHEJ » ou « B-NHEJ », par opposition au « D-NHEJ » classique impliquant DNA-PK (Wang et al., 2003a).

Il a été proposé que, dans ces « voies de secours » de la réparation des cassures double-brin, certains facteurs traditionnellement mis en jeu dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN puissent intervenir (figure 7b).

a) L'ADN-ligase III

L'activité de B-NHEJ peut être inhibée à 80% par introduction d'un siRNA dirigé contre l'ADN-ligase III (LigIII) dans des cellules déficientes en DNA-PK ou en Ku. Parallèlement, une étude de fractionnement d'extraits cellulaires par chromatographie a permis de montrer qu'une part significative de l'activité NHEJ est liée à la Ligase III, et non au complexe classique DNA-PK/XRCC4/ADN-ligase IV. L'ADN-ligase III, mise en jeu traditionnellement au cours de la réparation des cassures simple-brin de l'ADN (SSBR), semble donc être un composant important des mécanismes de B-NHEJ (Wang et al., 2005).

b) La poly(ADP-ribose) polymérase 1

L'activité B-NHEJ est aussi liée à l'activité de la Poly (ADP-Ribose) Polymérase 1 (PARP-1). Cette enzyme est connue pour son implication dans la reconnaissance, la signalisation, et la réparation des cassures simple-brin de l'ADN (voir plus bas le chapitre sur la réparation des cassures simple-brin de l'ADN). L'utilisation d'inhibiteurs de l'activité PARP-1 diminue fortement la réparation des cassures double-brin par B-NHEJ *in vivo* dans les cellules déficientes en ADN-Ligase IV ou en dimère Ku (Wang et al., 2006). L'utilisation des ces inhibiteurs entraîne aussi une augmentation de la cytotoxicité de la calichéamicine γ 1, un agent inducteur de cassures double-brin, confirmant l'implication de cette enzyme dans la

réparation des cassures double-brin (Audebert et al., 2004). PARP-1 et Ku sont en compétition pour la liaison au site de coupure, mais l'affinité supérieure de ce dernier facteur pour les extrémités d'ADN double-brin fait que le mécanisme de NHEJ utilisé classiquement est le NHEJ dépendant de DNA-PK. Lorsque cette recombinaison NHEJ classique ne peut s'appliquer, PARP-1 peut alors remplacer DNA-PK au niveau des extrémités de la cassure double-brin et assurer un rôle de maintien des extrémités de la molécule d'ADN endommagée grâce à ses capacités de dimérisation (Wang et al., 2006).

c) XRCC1

Dans le mécanisme de SSBR, la protéine XRCC1 (X-ray Repair Cross Complementing group 1, voir les détails dans le chapitre SSBR) est un partenaire privilégié de PARP-1 et de l'ADN-LigaseIII. Les extraits de cellules EM9 déficientes en XRCC1 présentent eux aussi une faculté réduite à réparer les cassures double-brin (Schwartz et al., 1987) (Nocentini, 1999), appuyant le rôle probable de cette protéine dans une même voie de B-NHEJ que PARP-1 et LigIII.

d) La polynucléotide kinase

Un candidat potentiel pour le traitement des extrémités des cassures double-brin dans les voies de B-NHEJ est la PolyNucléotide Kinase (PNK). Cette protéine, possédant des activités 5'-ADN kinase et 3'-ADN phosphatase, est connue pour être à la fois impliquée dans le mécanisme de réparation des cassures simple-brin (Whitehouse et al., 2001) et double-brin (Karimi-Busheri et al., 1999) de l'ADN. PNK est recruté sur les extrémités d'un ADN double-brin, conjointement à PARP-1, XRCC1 et LigIII *in vitro*. Par ailleurs, l'absence de PNK dans des extraits cellulaires entraîne une incapacité à relier les cassures double-brin de l'ADN présentant des extrémités 5'-OH. Enfin, la reconstitution synthétique d'un complexe de B-NHEJ comprenant les protéines PARP-1, XRCC1 et LigIII purifiées montre que la présence de PNK est indispensable à la réparation de ce même type de lésion (Audebert et al., 2006).

L'ensemble de ces données permet de proposer que le complexe de protéines PARP-1, XRCC1, LigIII et PNK, indispensable à la réparation des cassures simple-brin de l'ADN, est aussi capable de réparer les cassures double-brin de l'ADN dans un contexte de recombinaison NHEJ alternative, B-NHEJ (figure 7b). La ligation finale des deux brins de la molécule d'ADN peut alors se faire soit de manière indépendante, soit de manière simultanée (Audebert et al., 2006).

4. La réparation des cassures simple-brin de l'ADN, la réparation par excision de base

Les cassures simple-brin (SSB) comptent parmi les lésions les plus fréquentes de l'ADN. Ces interruptions du squelette sucre-phosphate d'un des deux brins de la molécule d'ADN surviennent par milliers chaque jour dans nos cellules, suite à une exposition à des rayonnements ionisants (rayons X, rayons gamma) ou à l'action de radicaux libres oxygénés (figure 1) (Lindahl, 1993). De même, la voie de réparation par excision de base (BER) aboutit indirectement à la formation d'une cassure simple-brin lorsque la base alkylée ou oxydée est excisée par une ADN glycosylase, puis le squelette sucre-phosphate de l'ADN incisé sous l'action d'une activité nucléase ou AP-lyase (Dianov and Parsons, 2007). La réparation de cette cassure se fait néanmoins de la même manière que celle d'une cassure simple-brin générée directement. Si ces lésions sont mal réparées, elles peuvent empêcher le bon déroulement de la réplication et de la transcription, et peuvent aussi être converties en cassures double-brin hautement toxiques pour la cellule (Kuzminov, 2001b). Le mécanisme global de réparation des cassures simple-brin (SSBR) sera décrit dans un premier temps, puis deux des principaux effecteurs de cette voie de réparation seront présentés en détail : XRCC1 (X-ray Repair Cross Complementing group 1) et PARP-1 (Poly(ADP-ribose) Polymérase-1).

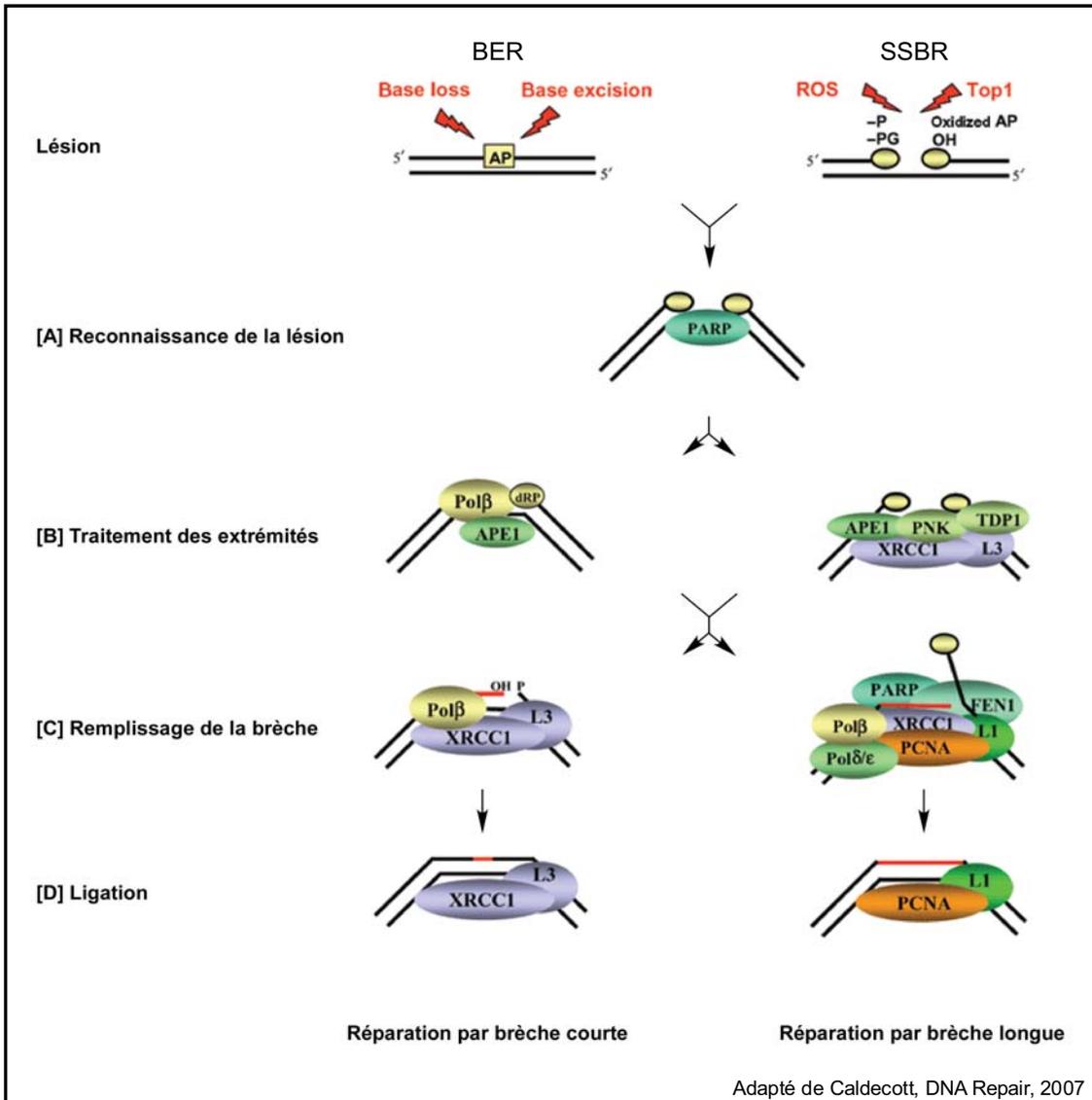


Figure 9 : Réparation des cassures simple-brin de l'ADN : les différentes étapes du BER et du SSBR. Après reconnaissance de la lésion par PARP-1, les extrémités de la cassure sont traitées pour permettre le remplissage de la brèche puis la ligation de l'ADN

A) Le mécanisme de réparation des cassures simple-brin de l'ADN

1) *Détection de la lésion – BER*

La réparation par excision de base ou BER est une des sources majeures de cassures simple-brin dans l'ADN. Cette voie de réparation requiert initialement la détection de la base endommagée par une ADN glycosylase spécifique, qui clive ensuite la liaison N-glycosidique reliant la base au squelette sucre-phosphate de l'ADN générant ainsi un site abasique (site AP apurique ou apyrimidique). La molécule d'ADN est ensuite incisée au niveau du site abasique, créant ainsi une cassure simple-brin (Fortini and Dogliotti, 2007) (figure 9).

La plupart des ADN glycosylases, telles l'uracile-ADN glycosylase, sont des enzymes monofonctionnelles et l'incision du squelette sucre-phosphate est ainsi réalisée par une endonucléase (Dianov and Parsons, 2007). L'AP endonucléase 1 humaine APE1 est la plus communément impliquée dans ce processus et génère ainsi une coupure simple-brin dans l'ADN présentant des extrémités 3'-OH et 5'-déoxyribose-phosphate (Chen et al., 1991) (Wilson and Barsky, 2001).

Certaines ADN glycosylases comme la 8-oxoguanine ADN glycosylase (OGG1) ou l'endonucléase III (NTH1) possèdent toutefois en plus une activité AP-lyase. Ces glycosylases bifonctionnelles peuvent cliver la liaison phosphodiester en 3' du site abasique par β -élimination, y générant un aldéhyde 3'- α,β -insaturé ou 3' déoxyribose-phosphate (Dherin et al., 1999) (Boiteux and Radicella, 1999) (Boiteux and Radicella, 2000) (Aspinwall et al., 1997). Les protéines NEIL1 et NEIL2, similaires à l'endonucléase VIII, peuvent elles aussi cliver le squelette de la molécule d'ADN après avoir retiré la base endommagée, par une réaction de β,δ -élimination, créant une cassure simple-brin de l'ADN pourvue d'une extrémité 3'-phosphate (Hazra et al., 2002) (Hazra and Mitra, 2006).

La multitude des glycosylases et endonucléases mises en jeu dans cette étape initiale du BER implique une grande diversité de configuration des extrémités de la coupure simple-brin générée. Afin de favoriser le traitement ultérieur de cette coupure, ces enzymes interagissent étroitement avec des facteurs responsables des étapes suivantes des voies de réparation des

cassures simple-brin de l'ADN. On constate ainsi que XRCC1, élément central du SSBR, interagit avec NEIL1 (Wiederhold et al., 2004), NEIL2, NTH1 (Campalans et al., 2005) ainsi qu'avec APE1 (Vidal et al., 2001) et OGG1 (Marsin et al., 2003) et stimule l'activité de ces deux dernières enzymes.

2) Détection de la lésion - SSBR

La première étape de la voie de réparation des cassures simple-brin ou SSBR est la détection et la signalisation de la coupure. Cette tâche incombe à la Poly(ADP-ribose) Polymérase 1 (PARP-1) qui reconnaît la cassure simple-brin et induit par sa fixation au niveau de la cassure une courbure de 102° dans la molécule d'ADN (Le Cam et al., 1994) (de Murcia and Menissier de Murcia, 1994) (cf. figure 9A). Cette enzyme, souvent accompagnée d'une autre protéine de la même famille, PARP-2 (Ame et al., 1999), se fixe ainsi très rapidement au site de la lésion et s'y active sous forme d'homodimère. Une fois activée, PARP-1 catalyse la synthèse d'un long polymère branché d'ADP-ribose, le poly-ADP-ribose (PAR), qu'elle greffe de façon covalente sur elle-même, en trans, dans une réaction dite d'automodification (Mendoza-Alvarez and Alvarez-Gonzalez, 1993). La liaison de PARP-1 à l'ADN est transitoire : après son activation et son automodification, l'enzyme se dissocie du site de coupure par un mécanisme de répulsion de charges entre le PAR chargé négativement et l'ADN chargé, lui aussi, négativement (Ferro and Olivera, 1982) (Zahradka and Ebisuzaki, 1982). Le polymère d'ADP-ribose est ensuite dégradé très rapidement par la Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG), permettant la réactivation de PARP-1 à un autre site de dommage. La synthèse du PAR par PARP-1 permet de recruter au site de la lésion les facteurs de réparation nécessaires à la résolution de la cassure grâce à leur affinité pour ce polymère. Par ailleurs, la modification post-traductionnelle qu'est la poly-(ADP-ribosy)lation peut aussi être catalysée sur d'autres protéines acceptrices, dans une réaction d'hétéromodification. PARP-1 modifie ainsi certaines enzymes de réparation, permettant de réguler leur activité, ou de les stabiliser au site de la lésion. C'est, entre autre, le cas pour XRCC1, qui est recruté au niveau de la cassure par le PAR, puis hétéromodifié par PARP-1 (Masson et al., 1998) (El-Khamisy et al., 2003). D'autre part, la modification des histones par PARP-1 permet une relaxation de la structure de la chromatine, et favorise ainsi l'accès des protéines de réparation au site du SSB (Poirier et al., 1982).

3) *Traitement des extrémités de la cassure*

Dans la grande majorité des cas, les extrémités 3' et 5' de la cassure simple-brin sont modifiées et ne permettent pas directement les étapes suivantes de remplissage de la brèche et de ligation. Une phase de traitement de ces extrémités est donc nécessaire afin de reformer les extrémités correctes 3'-OH et 5'-phosphate (figure 9B). Cette étape est sans doute celle qui implique la plus grande diversité d'activités enzymatiques au cours de la réparation des cassures simple-brin, du fait de la grande variété d'extrémités générées. Parmi les enzymes impliquées, on citera principalement la polynucleotide kinase (PNK), l'endonucléase AP-1 (APE1), l'ADN polymérase β (Pol β), la tyrosyl phosphodiesterase 1 (Tdp1) et la flap endonucléase-1 (FEN-1).

Au cours du BER, certaines cassures simple-brin de l'ADN, générées indirectement suite à l'excision de la base endommagée par une glycosylase et à l'incision par APE1 du site abasique ainsi créé, présentent une extrémité 5' déoxyribose phosphate (dRP) traditionnellement retirée grâce à l'activité 5'-dRP lyase de Pol β (Matsumoto and Kim, 1995). L'activité AP lyase des glycosylases bifonctionnelles OGG1 et NTH1 au cours du BER permet la formation d'une cassure présentant une extrémité 3'-déoxyribose-phosphate, qui est retirée par APE1 (Wiederhold et al., 2004) (Klungland et al., 1999). Les extrémités 3'-phosphate générées par l'action des enzymes NEIL1 et NEIL2, ou retrouvées au niveau des cassures simple-brin issues directement de l'oxydation d'un ribose de l'ADN, sont le plus souvent prises en charge par PNK afin de restaurer une extrémité 3'-OH conventionnelle (Wiederhold et al., 2004) (Whitehouse et al., 2001) (Rasouli-Nia et al., 2004). Les extrémités 3'- α,β aldéhyde insaturé sont elles, au contraire, réparées essentiellement grâce à l'intervention de APE1 (Izumi et al., 2000) (Parsons et al., 2004).

Tdp1 connue principalement pour son implication dans la réparation de cassures double-brin chez la levure est aussi capable, chez la levure comme chez l'homme, de traiter des extrémités de cassures simple-brin *in vitro* (Pouliot et al., 2001) (El-Khamisy et al., 2005). Le substrat typique de Tdp1 est constitué par les extrémités 3' des SSB résultant de l'activité incomplète de la topoisomérase 1 (TOP1) (Pouliot et al., 1999). Le blocage de l'activité TOP1 est observé lors d'un traitement par la camptothécine, molécule utilisée en thérapie anticancéreuse, ainsi qu'en présence de certaines structures secondaires ou certains types de

lésions de l'ADN (Pommier et al., 2003). L'activité de Tdp1 sur ces cassures aboutit à la formation d'une extrémité 3'-phosphate qui peut alors être traitée, de concert avec l'extrémité 5'-OH caractéristique de ce type de dommage, par la polynucléotide kinase PNK (Rasouli-Nia et al., 2004) (El-Khamisy et al., 2005). Rappelons que le syndrome de l'ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie axonale de type 1 (SCAN1) est lié à une mutation de Tdp1. Les cellules lymphoblastoïdes des patients atteints de cette maladie présentent un défaut évident dans la réparation des dommages oxydatifs et des lésions liées à l'activité de la topoisomérase 1 (Takashima et al., 2002). SCAN1 est certainement la maladie qui lie de la manière la plus évidente une maladie génétique humaine et un défaut de SSB, suggérant l'importance de ce mécanisme de réparation pour le développement et la survie neuronale (Caldecott, 2004).

La protéine plateforme XRCC1 joue, elle aussi, un rôle important au cours de cette phase de traitement des extrémités des coupures simple-brin de l'ADN. Elle interagit notamment avec PNK (Whitehouse et al., 2001) et Pol β (Kubota et al., 1996) (pour plus de détails voir ci-dessous la partie consacrée à la description détaillée de XRCC1). Elle ne possède pas d'activité enzymatique propre, mais elle stimule l'activité de PNK au niveau des extrémités des SSB (Whitehouse et al., 2001) (Loizou et al., 2004). Dans des cellules déficientes pour XRCC1 le traitement des extrémités 3'-phosphate et 5'-OH, classiquement effectué par PNK, devient alors une étape cinétiquement limitante (Whitehouse et al., 2001) (Sossou et al., 2005). *In vitro* les enzymes PNK et Pol β peuvent être recrutées au site de la lésion grâce à leur affinité pour les extrémités d'ADN de leurs substrats respectifs (Parsons et al., 2005b) (Parsons et al., 2005a). Néanmoins, leur interaction avec XRCC1 est importante *in vivo* pour recruter, stabiliser et stimuler ces protéines lors du SSB (Lan et al., 2004) (Loizou et al., 2004). Il a aussi été montré que XRCC1 interagit avec APE1, stimule son activité *in vitro* et pourrait ainsi avoir un rôle stimulateur sur l'activité *in vivo* de traitement des extrémités d'une cassure simple-brin par cette protéine (Vidal et al., 2001).

4) Remplissage de la brèche

Une fois les extrémités 3' et 5' de la lésions rétablies dans leur configuration conventionnelle, le remplissage de la brèche peut s'opérer (cf. figure 9C). Cela implique le plus souvent l'incorporation d'un nucléotide unique en remplacement de celui qui manque au

niveau de la cassure simple-brin. Néanmoins, dans certains cas, cette synthèse continue sur 2 à 20 nucléotides et la flap endonucléase-1 (FEN1) est alors chargée de retirer les nucléotides déplacés en 5', soit résidu par résidu, soit sous forme d'un oligonucléotide simple-brin, le « flap » (Klungland and Lindahl, 1997) (Liu et al., 2005) (Kim et al., 1998). Ces deux sous-mécanismes sont qualifiés respectivement de réparation par brèche courte et réparation par brèche longue (short patch repair et long patch repair).

Les premières études réalisées sur des cellules perméabilisées ont montré que différentes polymérases, notamment Pol β , sont impliquées dans le processus de réparation des cassures simple-brin de l'ADN, et que le choix de la polymérase dépend de la source de la lésion et de la longueur du fragment d'ADN à synthétiser (Miller and Chinault, 1982) (DiGiuseppe and Dresler, 1989) (Park et al., 1989). Par la suite, l'utilisation de molécules d'ADN présentant des lésions définies a confirmé l'implication de Pol β dans l'étape du remplissage de la brèche mais aussi celle des polymérases Pol δ et Pol ϵ (Fortini et al., 1998; Stucki et al., 1998). De manière générale ces études suggèrent que Pol β est la polymérase prédominante dans la réparation par brèche courte, alors que la réparation par brèche longue implique Pol β et/ou Pol δ /Pol ϵ .

Ces résultats proviennent d'études réalisées *in vitro*, mais il a aussi été montré *in vivo* que Pol β est requise pour la réparation des cassures simple-brin issues du BER (Fortini et al., 2000) (Pascucci et al., 2005), bien que son rôle précis (traitement des extrémités 5' d'RP et/ou remplissage de la brèche) n'ait pas été déterminé. Par contre, Pol β ne semble pas être impliquée dans la réparation des SSBs induits par l'agent oxydant H₂O₂ (Fortini et al., 2000), montrant la redondance qui existe entre les différentes polymérases impliquées dans la réparation des dommages oxydatifs *in vivo*. Il a par ailleurs été montré que, outre le recours possible à Pol δ /Pol ϵ en cas de déficience en Pol β , les polymérases Pol λ et Pol ι sont aussi impliquées dans le BER (Garcia-Diaz et al., 2002) (Bebenek et al., 2001). Le mécanisme responsable du choix de la polymérase impliquée selon le type de lésion à traiter reste encore inconnu à ce jour.

En dehors des ADN polymérases responsables du remplissage de la brèche, d'autres protéines annexes sont requises lors de cette étape. PARP-1 et FEN-1 stimulent l'activité de Pol β au cours de la réparation des cassures simple-brin par brèche longue (Dantzer et al., 2000) (Prasad et al., 2000) (Prasad et al., 2001). L'anneau de processivité PCNA est aussi

impliqué notamment pendant les étapes de remplissage des brèches longues par Pol δ /Pol ϵ . Enfin, XRCC1, par son interaction avec PCNA (Fan et al., 2004) et Pol β (Kubota et al., 1996) et par la démonstration *in vivo* de son importance pour le recrutement, l'accumulation et la stabilité de ces deux protéines au niveau des SSBs, est aussi susceptible d'intervenir dans cette étape du SSBR.

5) Ligation des deux extrémités de la lésion

La dernière étape de la réparation des cassures simple-brin est la ligation des extrémités de la coupure d'ADN (voir figure 9D). La diversité des ADN polymérase existant chez les mammifères a été décrite précédemment et cette diversité se retrouve aussi au niveau des ADN ligases. On dénombre trois gènes d'ADN ligases chez l'Homme, codant pour au minimum cinq polypeptides différents (Timson et al., 2000).

L'ADN Ligase III est présente sous deux isoformes α (LigIII α) et β (LigIII β) qui diffèrent par leur structure et leur fonction dans l'organisme. Les deux isoformes possèdent un domaine de liaison à l'ADN comprenant un motif doigt de zinc de type CCHC fortement homologue à ceux retrouvés chez PARP-1 et ayant pour particularité sa capacité à reconnaître les cassures dans l'ADN (Mackey et al., 1999). Contrairement à LigIII β , LigIII α possède un domaine BRCT (voir la définition de ce domaine au chapitre suivant) qui lui procure sa spécificité de fonction au sein des voies de réparation de l'ADN, notamment par son interaction avec le facteur XRCC1 (Caldecott et al., 1994). Différentes études ont prouvé l'implication de LigIII α dans la réparation des cassures simple-brin directes, comme indirectes (survenant au cours du BER). Dans les cellules CHO déficientes en XRCC1, le niveau d'expression de LigIII α est diminué d'environ cinq fois par rapport à celui observé dans les cellules sauvages du fait de la déstabilisation de cette ligase en l'absence de son partenaire de XRCC1, ce qui entraîne alors une diminution importante des activités de ligation de l'ADN durant la réparation par brèche courte du BER (Wong et al., 2005) (Cappelli et al., 1997). Par ailleurs, l'ADN Ligase III α semble aussi la ligase privilégiée dans la réparation des SSBs directs médiée par Pol β (Winters et al., 1999). De manière intéressante, l'interaction entre XRCC1 et Pol β a une action stimulatrice sur la ligation observée dans des réactions de BER *in vitro*. Cela laisse supposer que cette interaction puisse participer au recrutement de LigIII α au site de cassure, à travers son interaction avec XRCC1, pendant le BER (Parsons et al., 2005a).

Cette interaction XRCC1 – LigIII α semble aussi importante pour la réparation rapide par BER des cassures simple-brin induites par les agents alkylants éthyl-méthanesulfonate et méthyl-méthanesulfonate (EMS et MMS), mais, en revanche, ne semble pas être nécessaire pour la réparation dépendante de XRCC1 des cassures simple-brin induites par EMS, au cours des phases S/G2 du cycle cellulaire (Taylor et al., 2000) (Moore et al., 2000) (Kubota and Horiuchi, 2003).

Des expériences biochimiques ont par ailleurs démontré que l'ADN Ligase I (LigI) peut, elle aussi, participer à la réparation des cassures simple-brin directes comme indirectes de l'ADN. A la différence de LigIII α , LigI semble préférentiellement impliquée au cours du processus de réparation par brèche longue (Matsumoto et al., 1999) (Winters et al., 1999) (Prasad et al., 1996). Cette préférence peut être expliquée en partie grâce à la faculté de LigI d'interagir avec PCNA, l'anneau de processivité impliqué dans la réparation par brèche longue (Levin et al., 2000). Un analogue de PCNA, le complexe Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1) pourrait lui aussi jouer un rôle au cours de la réparation des cassures simple-brin par brèche longue, par son interaction avec LigI et sa capacité à stimuler l'activité de cette dernière au cours du BER (Smirnova et al., 2005).

B) La protéine XRCC1

XRCC1 (Xray Repair Cross Complementing group 1) est un facteur essentiel de la réparation des cassures simple-brin de l'ADN. Cette protéine dépourvue d'activité enzymatique propre n'en a pas moins un rôle central dans la voie de réparation SSBR. Ses multiples interactions médiées par ses domaines protéiques lui permettent d'organiser les différentes étapes du SSBR par recrutement et stimulation de différents facteurs de réparation. Par ailleurs, le phénotype marqué des cellules déficientes en XRCC1 montre bien la grande importance de cette protéine dans le maintien de l'intégrité du génome. Enfin, de multiples polymorphismes de cette protéine ont été associés à des prédispositions aux cancers chez l'Homme.

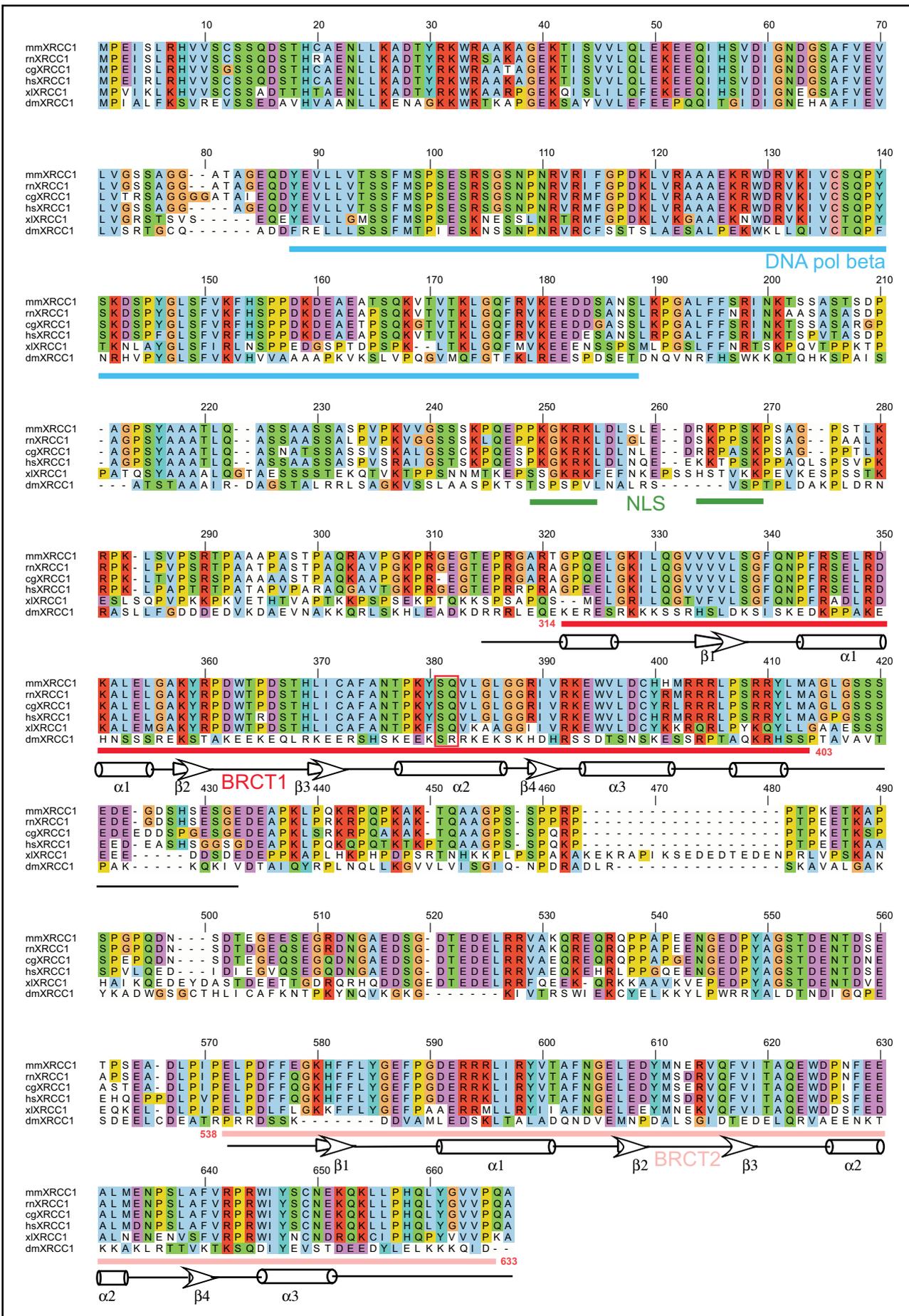


Figure 10 : Alignement multiple de séquences de XRCC1.
 mm = *Mus musculus*, rn = *Rattus norvegicus*, cg = *Cricetulus griseus*, hs = *Homo sapiens*,
 xl = *Xenopus laevis*, dm = *Drosophila melanogaster*

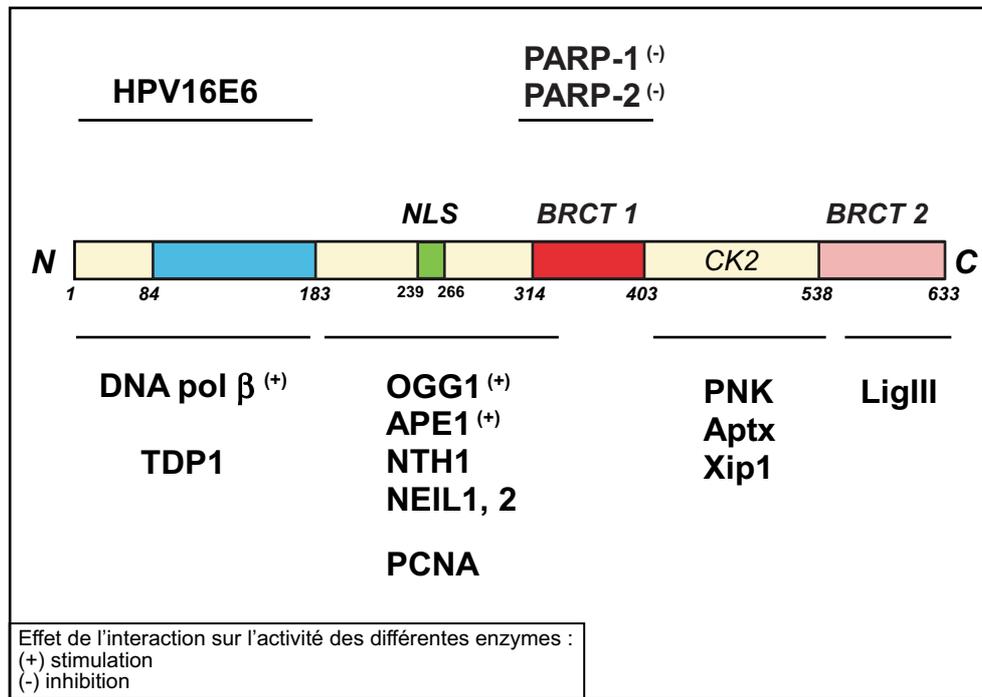
1) Les domaines structuraux et fonctionnels de XRCC1

XRCC1 est une protéine dont la séquence est fortement conservée au cours de l'évolution. La figure 10 présente un alignement des séquences de la protéine XRCC1 de différentes espèces eucaryotes.

Chez l'humain, le gène encodant cette protéine est localisé sur le chromosome 19q13.2 (Mohrenweiser et al., 1989), s'étend sur 32 kb et est composé de 17 exons (Lamerdin et al., 1995). XRCC1, chez l'Homme, est un peptide de 633 acides aminés comportant différents domaines structuraux et fonctionnels (figures 10, 11 et 12).

a) Le domaine N-terminal

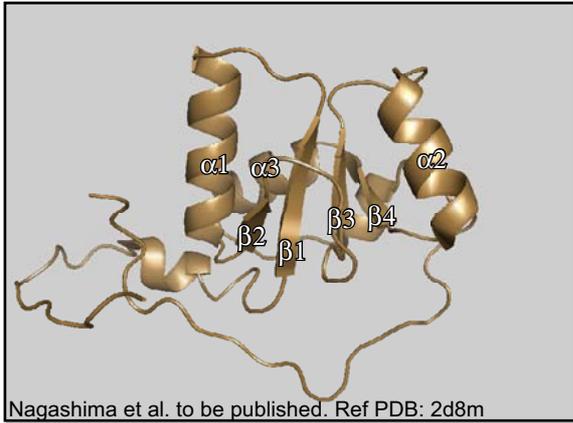
Il s'étend des acides aminés 1 à 314 et inclue le signal de localisation nucléaire (résidus 239 à 266 (Masson et al., 1998)) responsable de la localisation cellulaire de la protéine. Cette partie N-terminale ne présente pas de motif structural particulier, mais assure l'interaction avec de nombreux partenaires des voies de réparation de l'ADN. Les résidus 84 à 183 forment le site d'interaction avec l'ADN polymérase β (Kubota et al., 1996) au cours du BER/SSBR. XRCC1 assure ainsi le recrutement de Pol β sur l'ADN endommagé (Lan et al., 2004) (Dianova et al., 2004) et la stimulation de son activité (Petermann et al., 2006). Une interaction entre XRCC1 (aa 1-170) et l'oncoprotéine E6 du papillomavirus humain HPV E16 a aussi été décrite. Cette interaction pourrait, d'une part, perturber le bon déroulement de la réparation de l'ADN, entraînant une instabilité du génome favorisant la transformation tumorale de la cellule infectée et, d'autre part, détourner éventuellement Pol β de son rôle dans la réparation de l'ADN, par compétition pour son site de fixation sur XRCC1, au profit de la réplication virale (Iftner et al., 2002). PCNA, un autre partenaire de XRCC1 ayant une fonction première d'anneau de processivité au cours de la réplication de l'ADN, interagit aussi avec le domaine N-terminal (aa 166-310) mettant en avant l'implication de XRCC1 dans la réparation des cassures simple-brin par brèche longue et dans la réparation des lésions de l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire (Fan et al., 2004).



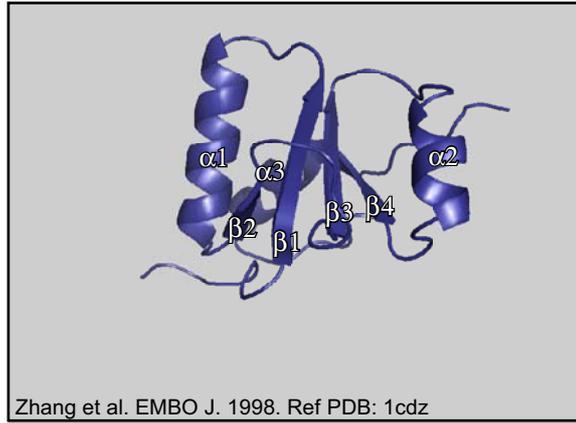
Références:

DNA Polβ	Kubota et al. (1996) EMBO J. 15, 6662-6670
Tdp1	Plo et al. (2003) DNA Repair 2, 1087-1100
HPV E6	Ifner et al (2002) EMBO J 21,4741
PCNA	Fan et al., (2004) Nucl. Acids Res. 32, 2193-2201
PARP-1	Masson et al. (1998) Mol. Cell. Biol., 18 3563-3571
PARP-2	Schreiber et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 23028-23036
APE I	Vidal et al. (2001) EMBO J. 20, 6530-6539
OGG1	Marsin et al. (2003) J. Biol. Chem. 278, 44068-44074
CK2 phosphorylation sites	Loizou et al. (2004) Cell 117, 17-28
PNK	Whitehouse et al. (2001) Cell 104, 107-117
Aptx	Gueven et al. (2004) Hum. Mol. Genet 13, 1081-1093
Xip1	Bekker-Jensen et al. (2007) J.Biol.Cell 282, 19638-19643
DNA Ligase III	Caldecott et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 68-76
NEIL1	Wiederhold et al. (2004) Mol. Cell 15, 209-220
NTH1, NEIL2	Campalans et al; (2005) DNA Repair 4, 826-835

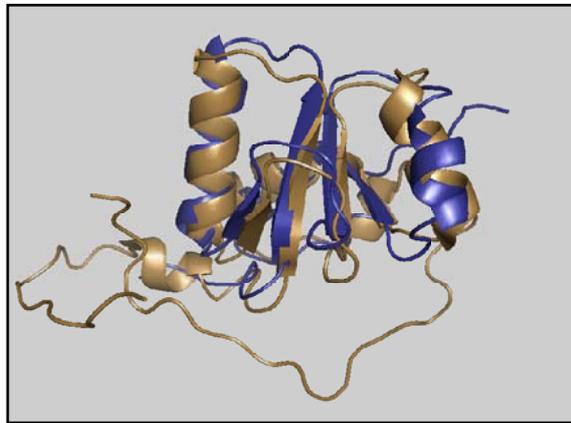
Figure 11 : Représentation schématique des domaines de XRCC1 et de leurs interactions protéiques.



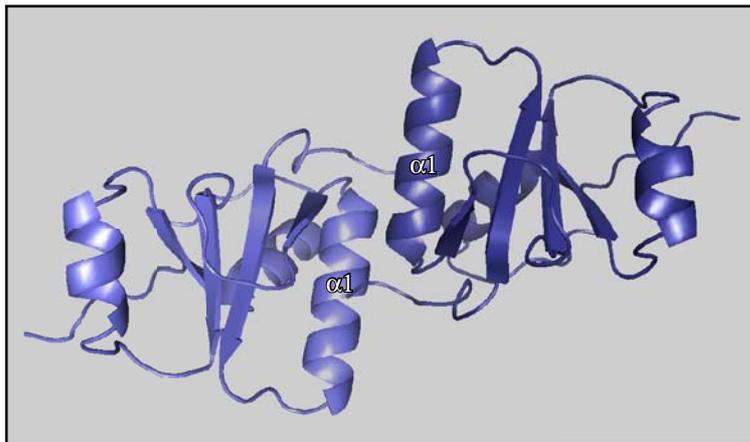
a) Structure du domaine BRCT1
obtenue par résonance magnétique
nucléaire



b) Structure du domaine BRCT2
obtenue par cristallographie et diffraction
aux rayons X



c) Alignement des domaines BRCT1 et BRCT2



d) Dimérisation du domaine BRCT2 par son hélice $\alpha 1$

Figure 12 : Structures tridimensionnelles des domaines BRCT1 et BRCT2 de XRCC1.

b) Le domaine BRCT1(BRCA1 C-Terminal domain 1)

Compris entre les résidus 314 et 403, ce domaine présente de fortes homologies de séquence avec l'extrémité C-terminale de la protéine associée au cancer du sein BRCA1. Les domaines BRCT sont des motifs de 80 à 100 acides aminés, retrouvés notamment dans un grand nombre de protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et la réparation des lésions de l'ADN. Différentes études ont ainsi prédit ou démontré la présence de tels motifs dans plus d'une centaine de protéines différentes (Koonin et al., 1996) (Bork et al., 1997). Les domaines BRCT ont une séquence généralement bien conservée au cours de l'évolution (figure 10), et ils ont une structure secondaire commune constituée d'un feuillet de quatre brins β entouré de trois ou quatre hélices α (voir figure 12a, b et c). Ce domaine peut être présent en un ou plusieurs exemplaires au sein d'une même protéine et est souvent présent sous forme de tandem comme pour BRCA1. Il a été démontré que ces tandems de domaines BRCT sont impliqués spécifiquement dans la liaison de protéines présentant des sérines phosphorylées. Ces interactions régulées par la phosphorylation d'un des partenaires pourrait être à la base du mécanisme d'action de BRCA1 et d'autres protéines des points de contrôle du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN (Yu et al., 2003a) (Glover et al., 2004). XRCC1 possède deux domaines BRCT distincts, mais ceux-ci sont trop distants pour pouvoir constituer un tandem. Ils assurent néanmoins une part importante du réseau d'interaction protéine/protéine de XRCC1 (figure 11). BRCT1 est ainsi le domaine d'interaction de XRCC1 avec les protéines poly(ADP-ribose)polymérase 1 et 2 qui sont à l'initiation de la réponse cellulaires aux cassures simple-brin de l'ADN (Masson et al., 1998) (Schreiber et al., 2002). XRCC1 est recruté et accumulé au niveau de la lésion sur le polymère d'ADP-ribose (PAR) synthétisé par les PARP-1 et 2 (El-Khamisy et al., 2003). Ce recrutement est rendu possible par la présence d'un motif composé d'acides aminés basiques (aa 379 à 400) donnant sa forte affinité pour le PAR au domaine BRCT1 de XRCC1 (Pleschke et al., 2000). En réponse à cette interaction avec PARP-1 ou PARP-2, XRCC1 voit aussi son domaine BRCT1 modifié par greffage covalent d'un polymère d'ADP-ribose (Schreiber et al., 2002). Les effets de cette modification sont assez mal connus mais il a été démontré que le domaine BRCT1 est essentiel à la survie des cellules après endommagement de l'ADN. Des cellules déficientes en XRCC1 restaurées avec une forme portant une ou plusieurs mutations au sein du BRCT1 se révèlent ainsi être aussi sensibles aux agents alkylants que les cellules non restaurées. (Taylor et al., 2002) (Kubota and Horiuchi, 2003). Ce problème de survie des cellules exprimant une

forme mutée du BRCT1 et exposées aux agents alkylants ne semble pas lié à une altération de la cinétique des voies de BER/SSBR. En revanche, ce même domaine BRCT1 s'avère indispensable au redémarrage des fourches de réplifications après réparation de l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire, suggérant un rôle pour XRCC1 dans la réparation des dommages de l'ADN couplée à la réplication (Kubota and Horiuchi, 2003). En plus des rôles précédemment décrits, le domaine BRCT1 de XRCC1, de concert avec son domaine N-terminal, est partiellement responsable des interactions avec les glycosylases OGG1 (Marsin et al., 2003), NEIL1, 2 et NTH1 (Wiederhold et al., 2004) (Campalans et al., 2005), ainsi qu'avec l'endonucléase APE1 (Vidal et al., 2001). Ces protéines sont à l'origine du traitement des bases endommagées et, dans le cas de OGG1 et APE1, cette interaction permet la stimulation de l'activité de ces protéines et favorise le bon déroulement du BER.

c) Le domaine intermédiaire « linker »

Située entre les deux domaines BRCT, cette région contient des sites de phosphorylation pour la caséine kinase 2 (CK2) (acides aminés 403 à 538). CK2 est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire, vitale pour la croissance et la survie cellulaire (Litchfield, 2003). Elle est notamment impliquée dans la réponse au stress cellulaire en phosphorylant la sérine 392 de p53, stimulant ainsi son activité sur la transcription. Il a été démontré que XRCC1 est une protéine phosphorylée *in vivo*. La séquence de XRCC1 contient huit sites potentiels de phosphorylation pour CK2, situés en aval du domaine BRCT1. L'étude *in vitro* de la phosphorylation de peptides synthétiques par CK2 a confirmé la phosphorylation de la thréonine 488, de la sérine 518 et de la thréonine 523, ainsi que d'autres acides aminés en dehors des sites prédits par l'étude de la séquence de XRCC1 (Loizou et al., 2004). Ce domaine linker est par ailleurs connu pour interagir avec la polynucléotide kinase (PNK) (Whitehouse et al., 2001) et avec l'aprataxine (Aptx) (Gueven et al., 2004) (Luo et al., 2004), deux enzymes mises en jeu lors du traitement des extrémités des cassures simple-brin dans les voies de BER/SSBR, ainsi qu'avec un troisième partenaire Xip1 (XRCC1 Interacting Protein 1) récemment identifié (Bekker-Jensen et al., 2007). L'interaction entre XRCC1 et PNK, dépendante de la phosphorylation de XRCC1 par CK2, stimule l'activité de cette kinase. La mutation de ces sites de phosphorylation entraîne une baisse de l'affinité entre les deux protéines ainsi qu'une diminution de l'efficacité de réparation des cassures simple-brin de

l'ADN (Loizou et al., 2004). L'interaction entre XRCC1 et Apx est, elle aussi, dépendante de la phosphorylation de XRCC1 par CK2. La cinétique de recrutement de Xip1 au niveau des lésions de l'ADN est très similaire à celle de XRCC1, et est dépendante de l'activité de PARP-1. En l'absence de Xip1, obtenue par ARN interférence, la survie des cellules traitées par des agents endommageant l'ADN est diminuée. Cela suggère l'implication de Xip1 dans la réparation et/ou la signalisation des lésions de l'ADN, conjointement à XRCC1. L'interaction entre ces deux protéines s'avère elle aussi dépendante de la phosphorylation de XRCC1 par CK2 (Bekker-Jensen et al., 2007). De manière intéressante, l'interaction entre PNK ou Apx et XRCC1 semble se faire de manière exclusive, c'est-à-dire que les deux protéines ne peuvent se retrouver associées à XRCC1 en même temps. Elles seraient donc présentes dans la cellule associées à XRCC1 sous forme de deux complexes préétablis distincts. Il a ainsi été suggéré que la formation de ces deux complexes pourrait être régulée par la phosphorylation de XRCC1 par CK2 (Luo et al., 2004). Par extrapolation, on peut imaginer que cette modification des différents sites CK2 de XRCC1 pourrait contrôler sa fixation aux domaines FHA des partenaires décrits. En effet, tous trois interagissent avec XRCC1 *via* un même domaine FHA (Fork Head Associated) d'une centaine d'acides aminés, retrouvé dans de nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, la transduction des signaux et la transcription (Durocher and Jackson, 2002). Différents complexes entre XRCC1 et des protéines à domaine FHA pourraient ainsi être formés sous le contrôle de l'activité CK2.

d) Le domaine BRCT2

Il s'étend entre les acides aminés 538 et 633, et présente lui aussi des homologies avec le domaine C-terminal de BRCA. Mais il ne présente toutefois que peu d'homologies de séquence avec le domaine BRCT1 (34% de similarité, 20% d'identité). Il ne comporte notamment pas le même motif d'acides aminés basiques qui donne au BRCT1 son affinité pour le PAR. Ces différences sont sans doute à l'origine de la diversité des fonctions assurées par ces deux domaines BRCT. Le domaine BRCT2 de XRCC1 est le premier domaine BRCT dont la structure tridimensionnelle a pu être déterminée par cristallographie aux rayons X (figure 12b, c et d), et les données obtenues grâce à lui ont servi à modéliser plusieurs autres domaines BRCT, comme celui de BRCA1 (Zhang et al., 1998). Ce domaine assure la liaison

entre XRCC1 et l'ADN Ligase III α (figure 11) qui possède de son côté un domaine BRCT lui aussi impliqué dans cette interaction. Le dimère XRCC1/LigIII α se forme donc grâce à l'hétérodimérisation des deux domaines BRCT (Caldecott et al., 1994) (Nash et al., 1997) (Taylor et al., 1998). La résolution de la structure du BRCT2 de XRCC1 a montré la capacité de ce dernier à dimériser, majoritairement grâce à des interactions entre les hélices $\alpha 1$ des deux unités BRCT (figure 12d) (Zhang et al., 1998). La séquence du domaine BRCT étant fortement conservée entre XRCC1 et l'ADN Ligase III α , on peut imaginer que les deux protéines interagissent sur un mode similaire. Le dimère XRCC1/LigIII α est un couple d'importance majeure au cours du BER/SSBR. Les deux protéines sont intimement liées et la disparition de XRCC1 entraîne une forte diminution du niveau d'expression de LigIII α dans les cellules d'ovaire de hamster chinois (cellules CHO) (Caldecott et al., 1994). Des études utilisant des formes de XRCC1 portant des mutations ponctuelles ou des mutations de délétion du BRCT2 ont montré que ce domaine est indispensable à la résolution des cassures simple-brin dans des cellules quiescentes, mais qu'il ne l'est pas pour la survie des cellules après traitement par un agent alkylant ou pour la réparation des cassures au cours de la phase S du cycle cellulaire. Ce rôle diamétralement opposé à celui du domaine BRCT1 montre bien la complexité et la diversité des fonctions de XRCC1 tout au long du cycle cellulaire.

2) Les lignées cellulaires déficientes en XRCC1

L'analyse des fonctions d'une protéine passe souvent par l'établissement et l'étude d'organismes déficients obtenus par disruption du gène encodant cette protéine. Dans le cas de XRCC1, la disruption du gène conduit, chez la souris, à une mortalité précoce, dès le jour 6,5 de vie embryonnaire et interdit donc l'établissement de souches murines déficientes pour cette protéine (Tebbs et al., 1999). Ainsi, les études des mécanismes cellulaires en absence de XRCC1 se sont faites principalement sur des lignées cellulaires déficientes. Quatre lignées cellulaires présentant un niveau d'expression de XRCC1 très faible, voir nul ont été décrites à ce jour. En 1982, deux lignées cellulaires déficientes pour XRCC1 ont été isolées lors d'un criblage de cellules CHO AA8 après mutagenèse aléatoire, sur la base de leur forte sensibilité à l'agent alkylant EMS. La lignée EM7 se caractérise par la mutation de l'acide aminé 362 entraînant un défaut du splicing de l'exon 9 de la protéine. La souche EM9 présente une mutation entraînant l'apparition d'un codon stop après l'acide aminé 220 (Thompson et al.,

1982). En 1992, un criblage similaire sur des cellules CHO9 a permis d'isoler deux autres souches déficientes. La souche EM-C11 est caractérisée par la mutation ponctuelle C390Y, et la souche EM-C12 par la mutation E102K (Zdzienicka et al., 1992) (Shen et al., 1998). D'autres approches utilisant la déplétion de XRCC1 par ARN interférence (siRNA-XRCC1) ont permis de compléter ces études. Les phénotypes des cellules décrits au cours de ces différents travaux sont très similaires et on peut proposer quatre aspects principaux.

a) Hypersensibilité aux agents génotoxiques

Les quatre lignées cellulaires EM7, EM9, EM-C11 et EM-C12 déficientes en XRCC1 sont près de dix fois plus sensibles à l'EMS et au MMS que les cellules sauvages. Outre ce problème de survie qui a été à la base de leur mise en évidence, ces cellules présentent une sensibilité accrue à un grand nombre d'autres agents génotoxiques tels le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), le N-éthyl-N-nitrosourée (ENU) (Thompson et al., 1982), les UV-A (Churchill et al., 1991), les rayonnements ionisants (Thompson et al., 1990), ou le peroxyde d'hydrogène (Cantoni et al., 1987). Ces cellules sont aussi plus sensibles à la camptothécine, inhibiteur de la topoisomérase 1 (Barrows et al., 1998), que les cellules sauvages. La déplétion de XRCC1 par ARN interférence dans des cellules humaines conduit elle aussi à une hypersensibilité au MMS, au peroxyde d'hydrogène ainsi qu'aux radiations ionisantes, confirmant l'importance de XRCC1 pour la survie des cellules exposées à un stress génotoxique (Brem and Hall, 2005).

b) Déficiences dans la réparation des cassures simple-brin

Si au niveau cellulaire, le défaut de survie après traitement par un agent génotoxique est le phénotype le plus clair pour les cellules n'exprimant pas XRCC1, au niveau des mécanismes cellulaires le phénomène le plus évident est la forte déficience dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN. La présence ou la persistance de ces cassures simple-brin de l'ADN chromosomique sont classiquement mises en évidence par des méthodes d'élution alcaline, de déroulement de l'ADN en conditions alcalines ou par électrophorèse alcaline sur cellule isolée (essai comète). L'utilisation d'un pH basique dans ces expériences permet de « révéler » la présence des cassures simple-brin. Les cassures double-brin sont aussi observées par ces

techniques mais leur contribution à cette analyse est généralement négligée du fait de leur faible représentation par rapport aux cassures simple-brin induites par les génotoxines utilisées. Les études initiales des cellules EM9 déficientes en XRCC1 ont ainsi décrit un ralentissement très important dans la cinétique de réparation des cassures simple-brin induite par l'EMS, le MMS ou les radiations ionisantes (Thompson et al., 1982). Ces résultats ont ensuite été confirmés et complétés par l'utilisation d'autres agents génotoxiques tels les déoxyuridines halogénées, le peroxyde d'hydrogène et les UV-A (Cantoni et al., 1987) (Churchill et al., 1991) (Dillehay et al., 1984). L'étude de cellules siRNA-XRCC1 montre, elle aussi, le ralentissement de la cinétique de réparation des cassures simple-brin (Brem and Hall, 2005). Le point précis faisant défaut lors de la réparation des cassures simple-brin de l'ADN dans les cellules n'exprimant pas XRCC1 reste mal défini. Compte tenu de l'importante diversité des interactions protéiques mettant en jeu XRCC1, les étapes intermédiaires bloquant la réparation en son absence pourraient être aussi bien la prise en charge d'un site abasique, le traitement des extrémités de la cassure, l'incorporation de nucléotides nécessaire au remplissage de la brèche, que l'étape finale de ligation de la cassure. L'étape du mécanisme de réparation de la cassure faisant défaut dans les cellules mutantes pour XRCC1 doit, au final, surtout dépendre du type de lésion traitée.

c) Déficiences dans la réparation des cassures double-brin

Comme précisé ci-dessus, des expériences à pH alcalin permettent de mettre en évidence les cassures simple-brin de l'ADN. On peut aussi analyser spécifiquement les cassures double-brin des chromosomes en travaillant à un pH plus neutre. Il a ainsi été reporté après analyse par élution neutre que la cinétique de réparation des cassures double-brin induites par rayons X est plus lente dans les cellules EM9 déficientes en XRCC1 que dans les cellules AA8 sauvages (Schwartz et al., 1987). Par ailleurs, des études par électrophorèse en champ pulsé à pH 8.0 ont montré un ralentissement dans la réparation des cassures double-brin dans les cellules EM9 et EM-C11 (Nocentini, 1999). Enfin, l'observation de l'apparition de micronoyaux dans les cellules EM9 déficientes en XRCC1 (Qu et al., 2005) (Sossou et al., 2005) ou dans des cellules siRNA-XRCC1 (Brem and Hall, 2005) permet aussi de supposer qu'il existe un problème de réparation des cassures double-brin dans ces cellules.

L'étude des cinétiques de réparation des cassures double-brin de l'ADN dans les cellules déficientes en XRCC1 doit soit faire en gardant à l'esprit que ce type de lésion peut apparaître indirectement suite à un défaut de réparation des cassures simple-brin. Ainsi, une explication au nombre élevé de cassures double-brin de l'ADN observé dans les cellules déficientes en XRCC1 en prolifération est plus grand nombre de fourches de réplication entrant en collision avec des cassures simple-brin non réparées. Néanmoins, l'implication directe de XRCC1 dans un mécanisme de réparation des cassures double-brin de l'ADN est tout à fait envisageable. PARP-1, partenaire majeur de XRCC1 responsable de son recrutement sur la lésion, a ainsi la capacité de reconnaître les cassures simple-brin et double-brin de l'ADN (Ikejima et al., 1990). De plus, l'inhibition de l'activité PARP-1 entraîne une sensibilisation aux agents inducteurs de cassures double-brin (Audebert et al., 2004). Un autre partenaire de XRCC1, la polynucléotide kinase est une enzyme impliquée dans le traitement des extrémités des lésions de l'ADN à la fois dans le SSBR et dans le DSBR (Whitehouse et al., 2001) (Karimi-Busheri et al., 1999) (Audebert et al., 2006). Enfin, l'activité de l'ADN Ligase III semble elle aussi associée à la réparation d'une certaine proportion de cassures double-brin de l'ADN par un mécanisme de recombinaison non homologue (Wang et al., 2005). Tous ces indices permettent de pressentir un rôle pour XRCC1 dans la réparation d'une sous-population de cassures double-brin, conjointement à d'autres partenaires traditionnellement mis en jeu dans les voies de BER/SSBR.

d) Perturbation de la réplication de l'ADN

De nombreuses études ont suggéré que l'hypersensibilité des cellules déficientes en XRCC1 aux agents génotoxiques est liée à la présence d'une grande quantité de cassures simple-brin non réparées lors du passage des fourches de réplication au cours de la phase S du cycle cellulaire. Lorsque l'expression de XRCC1 est réduite par ARN interférence, les cellules présentent un délai dans leur progression à travers le cycle cellulaire après un traitement au MMS (Brem and Hall, 2005). Les cellules EM9, cultivées en présence d'analogues halogénés de nucléotides (BrdU ou CldU) pendant un cycle, présentent une forte accumulation d'échange de chromatides sœurs (SCE) conséquence de la réplication de l'ADN halogéné lors du cycle suivant. Ces cellules cessent alors leur croissance (Thompson et al., 1982) (Dillehay et al., 1983) (Carrano et al., 1986). Ces études montrent aussi que dans les

cellules EM9, des cassures simple-brin sont accumulées dans ces ADN halogénés, et que l'ADN naissant issu de la réplication de ce modèle n'atteint sa taille mature qu'après un certain délai par rapport à la synthèse utilisant une molécule d'ADN non endommagée comme modèle. Ces observations suggèrent fortement que le délai dans la réplication des ADN halogénés est dû aux collisions entre les fourches de réplication et les cassures simple-brin non-réparées. Cela va de pair avec l'observation du nombre très élevé de SCE dans ces cellules car les cassures simple-brin non réparées peuvent être converties en cassures double-brin lors de collisions avec les fourches de réplication qui peuvent alors mettre en jeu la recombinaison homologe afin de reformer la fourche désassemblée (Kuzminov, 2001a) (Kuzminov, 2001b). Ainsi le délai important dans la maturation des ADN naissants lors de la réplication dans les cellules EM9 pourrait simplement refléter le nombre important de cassures simple-brin entrant en collision avec une fourche de réplication.

On peut aussi imaginer une implication directe de XRCC1 dans la réparation ou la tolérance des cassures simple-brin au contact de la fourche de réplication. Ainsi dans les cellules EM9 et EM-C11, un grand nombre de réarrangements spontanés ou induits (mutations ponctuelles, translocations, délétions, aberrations chromosomiques) sont observées (Thompson et al., 1982) (Zdzienicka et al., 1992) (Carrano et al., 1986) (Dominguez et al., 1998) (Op het Veld et al., 1994) (Op het Veld et al., 1998). La présence de délétions est particulièrement notable. Une explication possible à la présence de toutes ces mutations dans les cellules déficientes en XRCC1 est qu'elles sont le reflet de cassures simple-brin non réparées ayant été mal gérées au cours des phases S/G2 du cycle cellulaire. Ainsi l'absence de XRCC1 poserait un double problème : la quantité élevée de cassures non résolues et l'impossibilité de les prendre correctement en charge lors de la phase S du cycle cellulaire.

D'autres travaux ont permis de compléter ces résultats, montrant par analyse en gradient de sucrose que les cellules EM9 synthétisent moins d'ADN naissants de petite taille que des cellules sauvages quatre heures après un traitement au MMS. La conclusion est que dans les cellules EM9, le nombre d'origines de réplication qui démarrent après traitement par des agents génotoxiques est diminué par rapport à celui observé dans les cellules sauvages AA8. Cela met en avant un rôle pour XRCC1 dans le redémarrage des fourches de réplication après endommagement de l'ADN, et l'analyse de mutants ponctuels et de mutants de délétion de

XRCC1 a permis de montrer que son domaine BRCT1 est essentiel à cette fonction (Kubota and Horiuchi, 2003).

3) Le polymorphisme génétique de XRCC1

Les rôles multiples et centraux de XRCC1 dans la réparation de l'ADN font de cette protéine un acteur majeur du maintien de l'intégrité du génome. Il est donc naturel de chercher à savoir si d'éventuels polymorphismes de cette protéine pourraient être liés à un défaut de réparation des lésions de l'ADN et à une prédisposition au développement de cancers. De nombreuses études ont été consacrées à l'analyse des polymorphismes de XRCC1, et plus de soixante polymorphismes d'un nucléotide (SNP pour Single Nucleotide Polymorphism) de ce gène sont listés dans les bases de données informatiques, incluant une trentaine située dans des exons ou des régions promotrices (Hung et al., 2005b). Trois SNP sont particulièrement représentés dans les populations humaines et ont été à ce titre les plus étudiés.

a) Le SNP R194W

Ce polymorphisme est retrouvé dans les populations humaines à une fréquence de 13% (Ladiges et al., 2003) mais avec une certaine hétérogénéité selon la provenance géographique des individus. Il a notamment été l'objet de six études à grande échelle, comprenant toutes plus de 200 cas et rapportant un risque d'apparition de divers cancer réduit en présence de ce variant de XRCC1 (Goode et al., 2002). Ce résultat a été confirmé par une étude russe portant sur plus de 2000 individus montrant que le variant R194W est lié à une protection contre le cancer du poumon chez les patients fumeurs (Hung et al., 2005a). Une méta-analyse récente des différentes études réalisées sur ce polymorphisme a aussi confirmé une protection contre les cancers liés au tabac (Hung et al., 2005b). La méta-analyse permet de regrouper et recouper les résultats des différentes analyses conduites à travers le monde en tenant compte de l'ethnie, de l'âge, de l'hygiène de vie des patients, et permet ainsi obtenir des résultats moins biaisés que lors d'une étude unique.

Ce polymorphisme de XRCC1 semble donc être protecteur vis-à-vis de divers cancers, ce qui peut sembler surprenant car un SNP est communément associé à un risque accru de cancer. Néanmoins, les résultats des études épidémiologiques ont pu être confirmés par des études *in vitro*. Il a ainsi été montré que le défaut de survie au MMS des cellules EM9 déficientes en XRCC1 peut être restauré par l'expression du variant R194W (Takanami et al., 2005). De plus, les cellules d'individus exprimant ce variant se révèlent moins sensibles aux agents génotoxiques comme la bléomycine, un radiomimétique induisant des cassures simple et double-brin dans l'ADN, et le benzo[a]pyrène-diol-epoxide (BPDE), un agent génotoxique formant des adduits covalents sur la molécule d'ADN (Wang et al., 2003b). L'explication moléculaire de cette protection contre le cancer n'est pas encore connue. L'arginine 194 est située dans le domaine N-terminal de la protéine, au niveau des zones d'interactions avec PCNA, OGG1 et APE1 notamment. Ainsi la transition d'une arginine chargée positivement en un tryptophane hydrophobe pourrait-elle favoriser l'interaction avec certains partenaires de XRCC1 au cours de la réparation de l'ADN (Ladiges, 2006).

b) Le SNP R280H

Ce polymorphisme est retrouvé chez moins de 7% des individus (Ladiges et al., 2003) et a été l'objet de moins d'études que les deux autres. Une méta-analyse de huit études indépendantes a montré une légère augmentation du risque de développement d'un cancer associée à ce variant de XRCC1 (Hu et al., 2005). Une autre méta-analyse a conclu qu'il n'y a pas de lien notable entre le SNP R280H et une prédisposition au cancer (Hung et al., 2005b). Enfin, une troisième étude a reporté que le variant R280H entraîne une diminution du risque de développement d'un cancer du poumon chez les individus au tabagisme élevé (Hung et al., 2005a). Il est donc globalement difficile de conclure qu'il existe un impact éventuel de ce polymorphisme sur une prédisposition au cancer.

L'étude *in vitro* de ce variant de XRCC1 a fourni quelques résultats plus concluants. Les cellules lymphoïdes d'individus exprimant le variant R280H présentent un nombre important de cassures chromosomiques après traitement à la bléomycine traduisant une sensibilité accrue à cet agent génotoxique (Tuimala et al., 2002). Par ailleurs, l'expression de la forme R280H de XRCC1 se montre incapable de restaurer la sensibilité au MMS des cellules EM9. Un délai dans la réparation des cassures simple-brin a été mis en évidence par essai comète

dans ces cellules, suggérant que la forme R280H de XRCC1 est diminuée dans ses capacités de réparation de l'ADN.

c) Le SNP R399Q

Ce polymorphisme de XRCC1 est de loin le plus représenté, avec près de 27% d'occurrence dans la population (Ladiges et al., 2003) et est aussi le plus documenté. Différentes études ont montré une association entre ce SNP et l'apparition de différents cancers, parfois la favorisant, parfois la protégeant. Ainsi le SNP R399Q peut être lié à un risque accru de développement de cancer du poumon ou de l'estomac, mais aussi à une diminution du risque de développement d'un cancer de l'œsophage, de la vessie, ou de la peau (hors mélanome) (Goode et al., 2002). Une méta-analyse de différentes études a montré que globalement, ce SNP n'est pas lié à une prédisposition au cancer, mais que lorsque les individus sont répartis par classes selon leur provenance ethnique, ce polymorphisme est synonyme d'une augmentation du risque de développement d'un cancer chez les individus asiatiques et africains (Hu et al., 2005). Cette association entre le SNP R399Q et un risque de cancer n'a pas été trouvée dans le cas du cancer du poumon chez les populations européennes (Hung et al., 2005a). Une autre méta-analyse regroupant 12 études sur le cancer du poumon n'a pas montré de lien entre le polymorphisme R399Q et un risque élevé de cancer dans la population globale. En revanche, en séparant les individus selon leur degré de tabagisme, on trouve que le SNP R399Q protège les gros fumeurs contre l'apparition de cancer, alors qu'il semble favoriser l'apparition de cancer chez les fumeurs occasionnels. Cette même analyse recoupant les données de sept études sur le cancer du tractus aérodigestif a montré l'absence de lien avec le SNP R399Q. Les résultats combinés de quatre études sur le cancer de la vessie a montré une faible augmentation de la fréquence des cancers chez les individus porteurs de ce SNP. Enfin, les données réunies de onze études concernant le cancer du sein n'ont pas permis de démontrer un lien quelconque entre le SNP R399Q et une prédisposition à développer ce type de tumeur (Hung et al., 2005b).

Les données épidémiologiques relatives au polymorphisme R399Q sont assez contradictoires. Les études *in vitro* sont, quand à elles, un peu plus concordantes. Ainsi les cellules lymphoïdes d'individus porteurs du SNP R399Q accumulent plus de cassures chromosomiques, après exposition à la bléomycine, et d'adduits covalents sur l'ADN, après

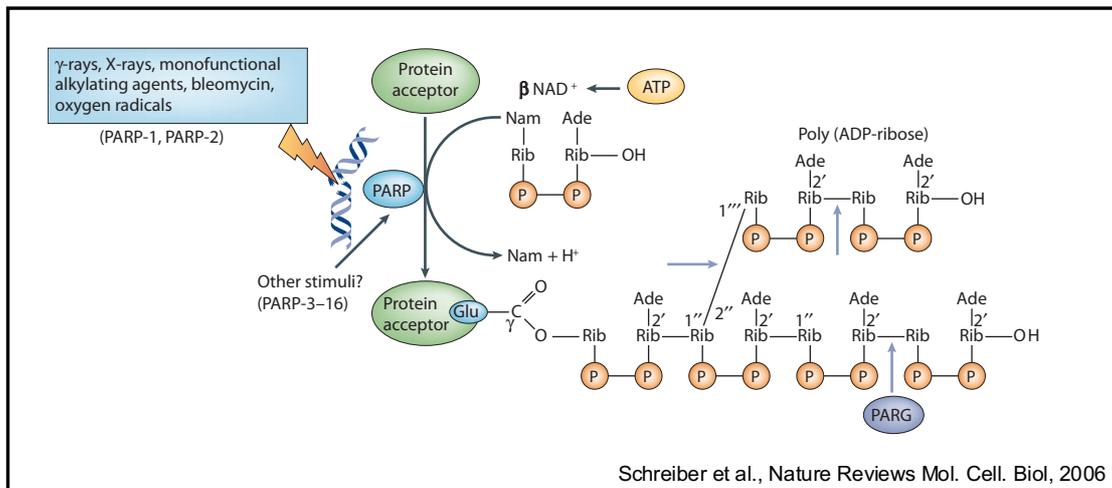
exposition au BPDE, que des cellules d'individus ne portant pas ce polymorphisme (Wang et al., 2003b). L'observation après exposition à l'aflatoxine B1 d'une quantité accrue d'adduits covalent aflatoxine B1-ADN dans les cellules d'individus portant le SNP R399Q confirme ces résultats (Lunn et al., 1999). En concordance avec ces études, on constate que l'irradiation aux rayons X ou UV de cellules sanguines induit plus de délétions chromosomiques pour les individus présentant le polymorphisme R399Q que pour ceux qui expriment la forme classique de XRCC1 (Au et al., 2003). Par ailleurs, l'expression de la forme R399Q de XRCC1 dans les cellules EM9 ne permet pas de restaurer leur défaut de réparation après traitement à la bléomycine et accumulent des micronoyaux qui traduisent la présence d'aberrations chromosomiques dans les cellules. Toutefois, en contradiction avec ces études, Taylor et al. n'ont pas observé de défaut de réparation des lésions de l'ADN induites par le MMS dans les cellules EM9 exprimant la forme R399Q de XRCC1 (Taylor et al., 2002).

L'arginine R399 est localisée au sein du domaine BRCT1 de XRCC1. Ce domaine est impliqué dans de nombreuses interactions protéiques et est nécessaire à la survie des cellules, mais pas à la réparation des cassures simple-brin, après exposition au MMS (voir précédemment la description de ce domaine). Il est intéressant de noter que les études *in vitro* ayant montré une sensibilité des cellules exprimant la forme R399Q ont toutes utilisé des agents génotoxiques introduisant simultanément des cassures simple- et double-brin dans l'ADN ou formant des adduits sur l'ADN. En revanche, les études de Taylor et al. ne montrant pas de sensibilité accrue des cellules exprimant ce SNP font appel à au MMS, agent induisant uniquement des alkylations de bases dans l'ADN et donc des cassures simple-brin dans les étapes intermédiaires du BER. On pourrait ainsi supposer un impact de ce polymorphisme dans une voie de réparation d'une certaine classe de cassures double-brin plutôt que dans la réparation des cassures simple-brin. Il faudrait pour confirmer cette hypothèse examiner la sensibilité des cellules exprimant la forme R399Q de XRCC1 à différents agents génotoxiques induisant spécifiquement des cassures simple- ou double-brin dans l'ADN.

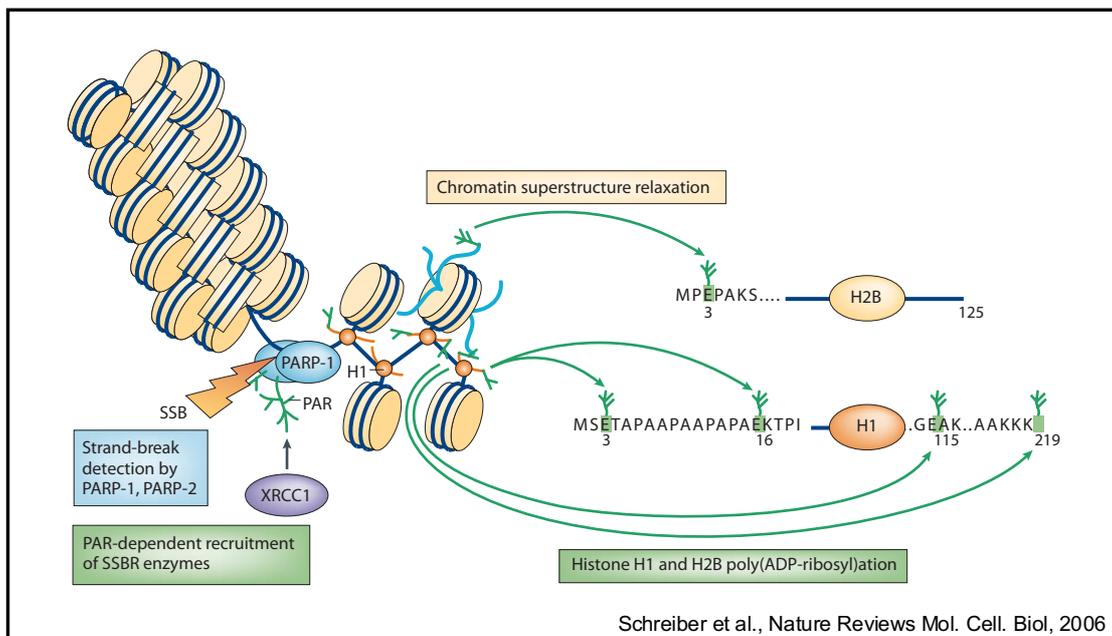
d) Les mutations ponctuelles de XRCC1

Au final, il est difficile d'établir un lien global clair et net entre un polymorphisme de XRCC1 et une prédisposition au cancer. Les SNP observables dans la population semblent

dans l'ensemble n'avoir que peu ou pas d'impact du tout. L'hétérogénéité des populations utilisées dans les études épidémiologiques peut être un frein majeur à l'obtention de résultats significatifs, et dans certains cas seules les études *in vitro* permettent de se faire une idée plus claire de la question. Néanmoins, l'absence de relation évidente entre un polymorphisme de XRCC1 et une prédisposition au cancer ne diminue pas l'importance de XRCC1 dans les mécanismes de réparation de l'ADN, bien au contraire. Ainsi on peut supposer que les rôles primordiaux de cette protéine dans le maintien de l'intégrité du génome font qu'une très forte pression de sélection y est associée, aboutissant à une sorte de loi du « tout ou rien ». Des polymorphismes n'ayant pas (ou très peu) d'impact sur les fonctions de la protéine seraient observables dans les populations, mais n'auraient pas d'effet très notoire sur la prédisposition au développement de cancers chez les individus porteurs. En revanche, un polymorphisme perturbant de manière significative les fonctions de XRCC1 serait si critique que l'organisme n'en serait pas viable. Il entraînerait une létalité embryonnaire précoce comme dans le cas d'une délétion de gène et interdirait par conséquent toute étude épidémiologique et seules des études *in vitro* permettraient peut-être d'obtenir des résultats. On notera ainsi que des mutations ponctuelles de XRCC1 affectant de manière significative ses fonctions au sein des voies de réparation de l'ADN ont déjà été décrites *in vitro*. Les cellules EM-C11 déficientes en XRCC1 exprimant la forme V86R de cette protéine présentent une efficacité de réparation des cassures simple-brin très réduite. Cette mutation est située dans le domaine d'interaction entre XRCC1 et Pol β , et abolit tout lien entre les deux protéines (Dianova et al., 2004). Les formes LI360/361DD et W385D interfèrent aussi avec les fonctions de XRCC1 et l'efficacité de réparation des cassures simple-brin. La double mutation LI360/361DD interdit au domaine BRCT1 d'adopter une configuration tridimensionnelle correcte, et les cellules exprimant ce mutant de XRCC1 présentent un défaut de survie après traitement au MMS (Taylor et al., 2002). La mutation W385D empêche, quant à elle, l'interaction entre XRCC1 et PARP-1 (El-Khamisy et al., 2003). Les cellules exprimant cette forme de la protéine présentent elles aussi une sensibilité importante au MMS (Taylor et al., 2002). Ces trois mutations ponctuelles ne sont pas retrouvées dans la nature, peut-être du fait de leur trop grande incidence sur les fonctions de XRCC1, mais elles permettent d'étudier *in vitro* des aspects spécifiques de cette protéine.



a)



b)

Figure 13 : Métabolisme du poly(ADP-ribose) lors de la réparation des lésions de l'ADN. a) En réponse aux cassures dans l'ADN, les poly(ADP-ribose) polymérase ADN-dépendantes (PARP-1 et PARP-2) hydrolysent le NAD⁺ et catalysent le transfert successif d'unités ADP-ribose sur des protéines nucléaires acceptrices. Cette modification est transitoire : le poly(ADP-ribose) est dégradé par la poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). b) La modification des histones par PARP-1 et PARP-2 en réponse aux dommages dans l'ADN permet la relaxation de la structure de la chromatine.

C) La poly (ADP-ribose) polymérase-1

Pour faire face à un stress génotoxique, les cellules eucaryotes ont développé diverses réponses physiologiques afin de permettre, soit la réparation des lésions dans l'ADN assurant la survie cellulaire, soit le déclenchement de la mort cellulaire par apoptose permettant l'élimination des cellules dont le matériel génétique est trop lourdement endommagé (Sancar et al., 2004). A la base de ces réponses diverses, on trouve des mécanismes fondamentaux de signalisation des dommages dans l'ADN. Ceux-ci passent souvent par des modifications post-traductionnelles de protéines, permettant à ces dernières d'acquérir des fonctions essentielles au bon déroulement de la réponse cellulaire au stress génotoxique. Une de ces modifications post-traductionnelles, la poly(ADP-ribosyl)ation, est catalysée en réponse aux lésions de l'ADN par les enzymes poly(ADP-ribose)polymérase-1 et 2 (PARP-1 et 2). Elle consiste en la synthèse d'un polymère branché d'ADP-ribose, le poly(ADP-ribose) (PAR), basée sur le métabolisme du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Cette synthèse peut être faite sur PARP-1 elle-même dans une réaction d'automodification, ou sur d'autres protéines nucléaires acceptrices, on parle alors d'hétéromodification. La poly(ADP-ribosyl)ation est une réaction coûteuse en énergie, mais transitoire et réversible par l'intervention de la poly(ADP-ribose)glycohydrolase (PARG) qui dégrade le polymère d'ADP-ribose grâce à son activité endo- et exo-glycosidase (figure 13a) (Schreiber et al., 2006).

1) La superfamille PARP

La superfamille PARP est composée de 17 membres ayant tous en commun la « signature » PARP, séquence conservée d'acides aminés correspondant au domaine catalytique de ces enzymes, définie à partir du repliement β - α -loop- β - α NAD⁺ de PARP-1 (voir figure 14). Leurs fonctions au sein de la cellule sont très hétérogènes, des PARP pouvant être impliquées dans les voies de réparation des lésions de l'ADN, dans la régulation de la transcription, dans la ségrégation mitotique, l'homéostasie des télomères ou la mort cellulaire. Les différents membres de la famille ont été répartis en sous-familles, d'après des critères structuraux ou fonctionnels communs. Actuellement, PARP-1 et PARP-2 sont les deux seules PARP activées par la présence de cassures dans l'ADN (Revue de (Ame et al., 2004) (Schreiber et al., 2006)).

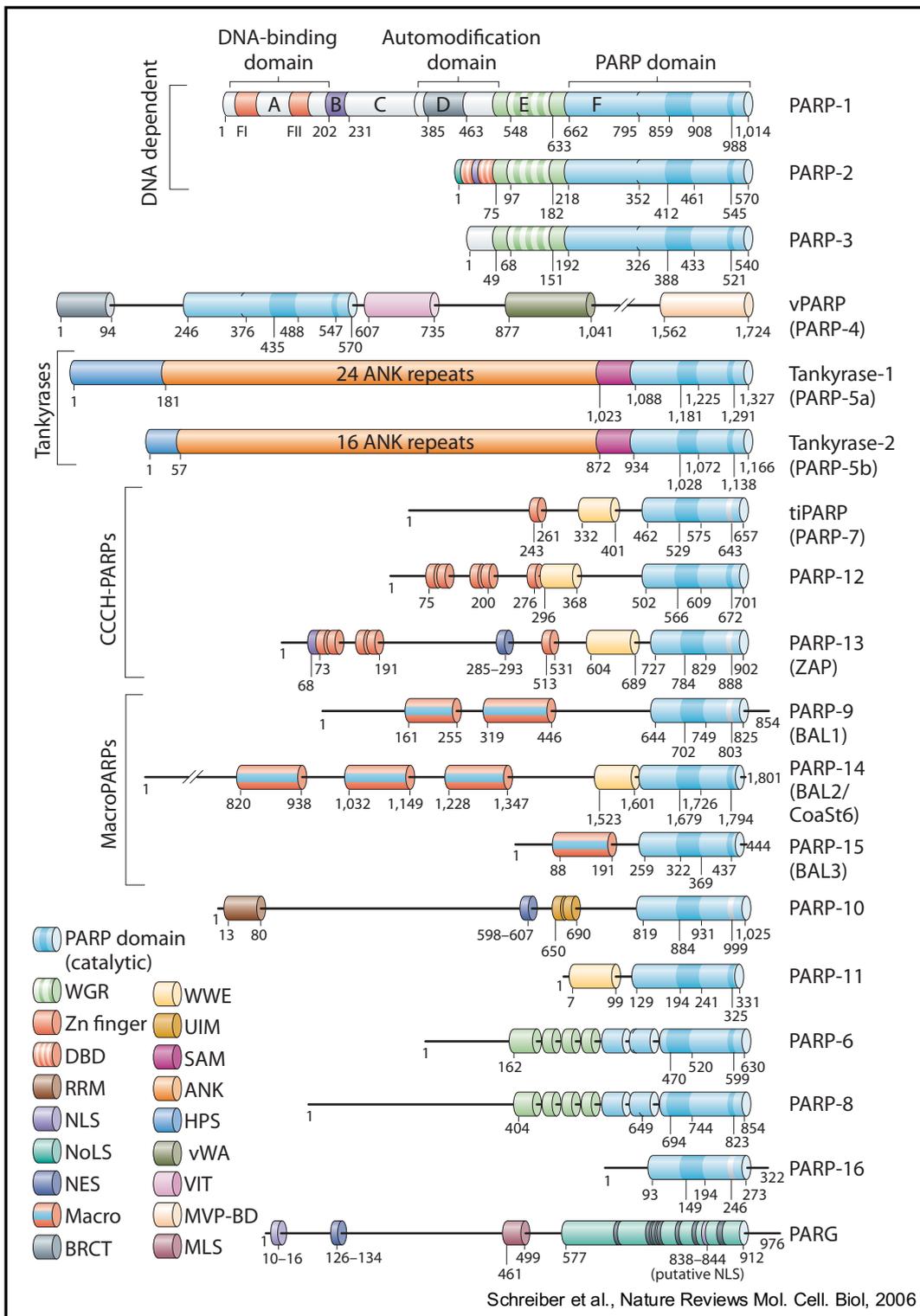


Figure 14 : La superfamille PARP. Représentation schématique des domaines architecturaux des 17 membres de la famille des poly(ADP-ribose)polymérase

a) PARP-1

Le membre fondateur de la famille, la PARP-1, est une protéine nucléaire de 113 kDa (figure 14). Elle se lie à l'ADN par son domaine N-terminal et la reconnaissance des cassures dans l'ADN s'effectue par l'intermédiaire de deux doigts de zinc (motif $CX_2CX_{28,30}HX_2C$) qui définissent une nouvelle classe de doigts de zinc spécialisés dans la reconnaissance des cassures dans l'ADN. On retrouve également ce motif dans l'ADN ligase III qui est une enzyme partenaire de PARP-1 dans la réparation des cassures simple brin de l'ADN (Mackey et al., 1999). Par ailleurs, PARP-1 possède un domaine central d'automodification comportant des résidus glutamates qui sont les cibles de l'automodification de la PARP-1, ainsi qu'un module BRCT impliqué dans les interactions avec la plupart de ses partenaires (histones, protéines HMG, topoisomérases I et II, ADN hélicases, facteurs du BER et du SSBR, facteurs de transcription). Enfin, le domaine catalytique est situé à l'extrémité C-terminale de la protéine.

La disruption du gène codant pour PARP-1 chez la souris a permis de prouver son implication dans la réparation des lésions de l'ADN in vivo (de Murcia et al., 1997) (Wang et al., 1997) (Masutani et al., 1999b) (voir plus loin, chapitre 3). Des travaux du laboratoire ont permis de déterminer des structures d'ADN fortement activatrices de PARP-1, comme les extrémités d'ADN double brin 5' récessives, structure retrouvée notamment aux télomères (Pion et al., 2005). PARP-1 est également activée par des boucles d'ADN, des ADN cruciformes, ou des polynucléosomes (Lonskaya et al., 2005) (Pion et al., 2005), ce qui peut expliquer l'activation de PARP-1 dans des situations autres que la réponse aux dommages, telles que le contrôle de la transcription (Kraus and Lis, 2003).

b) PARP-2

PARP-2 est une protéine nucléaire de 65 kDa. Son mode d'activation est similaire à celui de PARP-1, néanmoins son activité est 10 fois plus faible que celle observée pour cette dernière (Ame et al., 1999). Le domaine de liaison à l'ADN de PARP-2 est situé à son extrémité N-terminale, mais ne présente pas d'homologie structurale particulière avec d'autres protéines. Ce domaine comporte un signal de localisation nucléaire ainsi qu'un signal de localisation nucléolaire (Meder et al., 2005). Le domaine catalytique de PARP-2, localisé en

C-terminal, est très homologue à celui de PARP-1 avec 43% d'identité de séquence (figure 14).

Tout comme PARP-1, PARP-2 est impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN et les cellules déficientes pour cette protéine présente un défaut important de réparation des dommages induits par les agents alkylants (Schreiber et al., 2002). Il a été démontré au laboratoire que PARP-2 se lie aux brèches (« gaps ») de 1 à 2 nucléotides et non aux cassures simples brins comme PARP-1. En outre, elle présente une forte affinité pour des structures complexes telles que les ADN cruciformes, les régressions de fourche (« chicken foot ») ou les intermédiaires réactionnels de la réparation de l'ADN par les mécanismes du BER et du SSBR (« flap ») (données non publiées). Ces hétérogénéités de cibles dans l'ADN suggèrent une différence de fonction entre PARP-1 et PARP-2.

Le disruption du gène codant pour PARP-2 chez la souris a permis de montrer que PARP-2 est impliquée dans d'autres processus, comme le maintien de l'intégrité des télomères par son interaction avec TRF2 (Dantzer et al., 2004), la différenciation cellulaire au cours de la spermatogenèse (Dantzer et al., 2006) ainsi que la survie des lymphocytes T au cours de leur maturation (Yelamos et al., 2006).

c) Les tankyrases

Les Tankyrases-1 et -2 (PARP-5a et PARP-5b) participent à la maintenance des télomères et à leur ségrégation durant la mitose. Elles sont également retrouvées dans l'appareil de Golgi, les pores nucléaires et au niveau des centrosomes lors des mitoses (Smith et al., 1998) (Sbodio and Chi, 2002) (figure 14).

d) Les CCCH-PARP

Cette sous-famille comporte 3 membres : la tiPARP (PARP-7), PARP-12 et PARP-13, qui partagent un domaine d'organisation similaire comprenant le motif en doigt de zinc $CX_7-11CX_{3-9}CX_3H$ impliqué dans la fixation à l'ADN et potentiellement aux ARN, et le domaine catalytique caractéristique des PARP. PARP-13 est capable de lier les ARN rétroviraux par ses doigts de zinc évitant l'accumulation des particules rétrovirales et donc la propagation de

l'infection. Elle serait également capable de diriger ces ARN vers la dégradation par l'exosome (Gao et al., 2002) (Guo et al., 2004) (figure 14).

e) Les macro-PARP

Les macro-PARP désignent les protéines PARP-9, PARP-14 et PARP-15. Elles sont caractérisées par la présence de 1 à 3 domaines macro associés au domaine PARP. Ce domaine a été mis en évidence dans l'histone macro-H2A qui lui a donné son nom (Ladurner, 2003). C'est un domaine de liaison à l'ADP-ribose ou à certains de ses dérivés comme le poly(ADP-ribose) se liant par PARP-9 notamment (Karras et al., 2005). PARP-9 (BAL-1) et PARP-14 (BAL-2, CoaSt6) sont également connues pour leur rôle en tant que cofacteurs de transcription (Aguiar et al., 2005) (Goenka and Boothby, 2006) (figure 14).

f) Les autres PARP

PARP-3 s'associe préférentiellement au centriole fille dans les centrosomes et interfère dans la transition G1/S du cycle cellulaire (Augustin et al., 2003).

PARP-4 est le composant catalytique des particules de Vault, un complexe ribonucléoprotéique cytoplasmique localisé au niveau des pores nucléaires assurant le transport cytoplasme-noyau et impliqué dans la résistance multidrogue (Kickhoefer et al., 1999). PARP-4 est également présente dans le noyau et au niveau du fuseau mitotique (Liu et al., 2004).

PARP-10 est un partenaire de la proto-oncoprotéine c-Myc, régulateur transcriptionnel clé dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Yu et al., 2005). Il contient un domaine de liaison aux ARN et est un inhibiteur potentiel de certaines fonctions de c-Myc (Chou et al., 2006).

Jusqu'à présent aucun domaine structurel ou fonctionnel connu n'a été trouvé dans les PARP-6, 8, 11 et 16, il est donc difficile de spéculer sur leurs fonctions éventuelles.

2) *La réaction de poly(ADP-ribosylation)*

En réponse à la présence de dommages dans l'ADN, PARP-1 et PARP-2, fixées au site de la lésion, sont activées et catalysent une réaction de polymérisation d'unités adénosine diphosphate-ribose (ADP-ribose) basée sur le métabolisme du NAD. Le PAR synthétisé est très hétérogène, formé de plus de 200 unités d'ADP-ribose et il présente de multiples branchements comme montré sur la figure 13a. La synthèse de ce polymère est vitale pour la cellule, et son mécanisme a été l'objet de nombreuses études.

Les structures tridimensionnelles des domaines catalytiques de la PARP-1 de poulet ainsi que de la PARP-2 de souris ont été résolues. Elles présentent une homologie structurale avec le site actif de la toxine d'ADP-ribosylation de *Clostridium diphtheriae* (Ruf et al., 1996). Cette structure de repliement β - α -loop- β - α NAD⁺, conservée chez les orthologues de PARP-1, est considérée comme la signature PARP. La structure du domaine catalytique de PARP-2 révèle l'existence d'une boucle supplémentaire à l'entrée du site catalytique (Oliver et al., 2004). La présence de cette boucle pourrait expliquer pourquoi l'activité enzymatique de PARP-2 est dix fois moindre que celle de PARP-1 (Ame et al., 1999).

La connaissance de la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de PARP-1, complétée par des approches de mutagenèse dirigée, ont permis de déterminer le mécanisme catalytique de la réaction de poly(ADP-ribosylation) qui se déroule en deux étapes (Ruf et al., 1998). Lors de l'initiation, les PARPs catalysent le transfert des unités d'ADP-ribose provenant du NAD⁺ sur des accepteurs nucléophiles, classiquement le groupement γ -carboxyl d'une glutamine. Puis, durant l'élongation, les unités d'ADP-ribose sont greffées sur le 2'-hydroxyl du ribose de l'adénine ou du ribose du nicotinamide permettant le prolongement de la chaîne de poly(ADP-ribose) ou la constitution de différents branchements, respectivement (figure 13a).

3) Les rôles physiologiques de la poly(ADP-ribosylation)

a) Réparation des cassures de l'ADN et survie cellulaire

PARP-1 et PARP-2 sont des senseurs moléculaires des interruptions dans l'ADN et jouent un rôle clé dans l'organisation spatiale et temporelle de leur réparation. Afin de comprendre leur rôle *in vivo*, des lignées de souris déficientes pour chacune de ces protéines ont été générées (de Murcia et al., 1997) (Wang et al., 1997) (Masutani et al., 1999b) (Menissier de Murcia et al., 2003). Ces souris déficientes *parp-1^{-/-}* ou *parp-2^{-/-}* sont viables mais présentent une hypersensibilité aux agents alkylants MMS et MNU (N-nitroso-N-méthylurée) ainsi qu'aux rayonnements ionisants. Une instabilité génomique en résulte et se caractérise par des échanges de chromatides sœurs et des cassures chromosomiques particulièrement au niveau des centromères. Au cours de premières étapes des voies de réparation des lésions simples-brin de l'ADN, la synthèse de PAR au site de dommage, notamment l'auto-modification de PARP-1, permet le recrutement de facteurs de réparation comme XRCC1 grâce à leur forte affinité pour ce polymère (Pleschke et al., 2000) (Masson et al., 1998) (Okano et al., 2003). L'absence de PARP-1 ou de PARP-2 affecte ainsi la réparation des bases endommagées de l'ADN (Schreiber et al., 2002) (El-Khamisy et al., 2003). Les localisations subcellulaires de ces deux protéines et leurs différents partenaires protéiques suggèrent un rôle particulier dans la surveillance de l'intégrité des régions hétérochromatiques telles que les centromères, les télomères et l'ADN ribosomique (Menissier de Murcia et al., 2003) (Saxena et al., 2002) (Schreiber et al., 2006). L'ensemble de ces observations a montré que ces deux protéines constituent des facteurs de survie impliqués dans la surveillance et la maintenance de l'intégrité génomique ainsi que dans la réparation de cassures simple brins. En outre, la létalité embryonnaire précoce des souris *parp1^{-/-} parp2^{-/-}* dépourvues des deux protéines suggère qu'elles possèdent des fonctions essentielles spécifiques mais aussi des fonctions redondantes au cours du développement et dans la maintenance de la stabilité génomique (Menissier de Murcia et al., 2003). Ces propriétés sont exploitées en thérapie antitumorale. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs PARP permet d'amplifier l'effet de drogues antitumorales en dirigeant les cellules prolifératives vers l'apoptose (Curtin, 2005) (Smith et al., 2005) (Bryant et al., 2005). Certains inhibiteurs de PARP-1 sont d'ailleurs en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase III pour le traitement du mélanome.

Ainsi, les PARPs jouent un rôle important dans la survie cellulaire lors de dommages limités. Inversement, quand la quantité de lésions est trop importante et que la cellule ne peut plus y faire face, les mécanismes de mort cellulaire par apoptose sont déclenchés afin d'éviter la fixation de mutations dans le génome de la cellule, et leur transmission à la descendance (Norbury and Zivnotovsky, 2004). L'activation de p53 va initier des cascades d'activation transcriptionnelles aboutissant notamment à l'expression de la caspase 3, une protéase apoptotique, qui clive alors PARP-1 en deux fragments de 89 kDa et 24 kDa (Kaufmann et al., 1993). Ce clivage de PARP-1 permettrait de la neutraliser, évitant ainsi toute tentative de réparation futile de l'ADN ainsi que la déplétion en NAD⁺ et en ATP qui accompagnerait une activité PARP importante (Koh et al., 2005a). Cependant, lors d'un endommagement massif et rapide de l'ADN chromosomique, lié par exemple à un choc ischémique, la suractivation de PARP-1 peut entraîner le niveau de PAR cellulaire au-delà d'un seuil critique. Un mécanisme de mort cellulaire spécifique indépendant des caspases est alors mis en route. En effet, l'accumulation de PAR dans la cellule peut induire la translocation d'un facteur apoptotique, l'AIF (apoptosis inducing factor) et de l'endonucléase Endo-G hors de la mitochondrie. L'AIF s'associe alors dans le cytoplasme à Endo-G, puis ce complexe est dirigé vers le noyau de la cellule où il dégrade l'ADN. Cette dégradation de l'ADN active en retour PARP-1, et ce système auto-entretenu va aboutir à la mort cellulaire (Yu et al., 2002) (Hong et al., 2004) (Koh et al., 2005b) (Modjtahedi et al., 2006).

b) Plasticité de la chromatine, régulation de la transcription et de la réplication

Comme précisé précédemment, PARP-1 et PARP-2 sont les seules PARP connues à ce jour intervenant dans la réparation des cassures simple-brin et des bases endommagées notamment grâce à la modification de la structure de chromatine. En effet, certaines histones des nucléosomes, structures responsables de la condensation de la chromatine, sont les cibles de la synthèse de PAR au niveau du site de la lésion (figure 13b). Cette modification des histones provoque une décondensation locale de la chromatine, due à une répulsion des charges négatives portées par l'ADN et le Poly(ADP-Ribose) (Poirier et al., 1982) (Realini and Althaus, 1992). Cette ouverture de la structure de la chromatine facilite ainsi l'accès des composés majeurs du système de réparation de l'ADN : XRCC1, ADN polymérase β , ADN ligase III.

En outre, il a été constaté que PARP-1 joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle en réponse à des stimuli biologiques, chimiques ou physiques, *via* au moins deux mécanismes : soit par la modulation de la structure de la chromatine, soit par interaction directe avec les facteurs de transcription ou leur site de fixation. Comme décrit précédemment, la relaxation de la chromatine sous l'action de PARP-1 constitue une modification épigénétique de l'ADN qui pourrait, en plus de son implication dans les processus de réparation de l'ADN, jouer un rôle dans la régulation de la transcription. PARP-1 a été identifiée dans les années 1980 en tant que « TFIIC », un facteur qui supprime la transcription aléatoire opérée par l'ARN polymérase II en réponse à la présence de coudes dans la molécule d'ADN (Slattery et al., 1983). Chez la drosophile, PARP-1 est notamment présente au niveau de régions de la chromatine dont la transcription est inactive. Son activation et son départ consécutif sont aussi nécessaires pour que la transcription ait lieu (Kim et al., 2004). PARP-1 a également un effet stimulateur, indépendant de son activité de poly(ADP-ribosyl)ation, sur certains facteurs et cofacteurs de transcription (PAX6, AP-2, b-Myb et TEF1) (Kraus and Lis, 2003). Elle interagit et stimule NF- κ B, facteur de transcription régulant les gènes de l'immunité et de l'inflammation, vraisemblablement en absence de synthèse de PAR (Hassa et al., 2003).

Un rôle pour l'activité de PARP-1 au cours de la réplication de l'ADN a enfin été suggéré. Une activité accrue de PARP-1 a été observée dans les cellules en prolifération (Burzio and Koide, 1972) (Lehmann, 1974), au niveau des fourches de réplication (de Murcia et al., 1983) ainsi que sur la chromatine néo-synthétisée (Anachkova et al., 1989). PARP-1 interagit par ailleurs avec des protéines de l'appareil répliatif. Une association avec le complexe ADN polymérase α -primase (Pol α -primase) a été reportée (Simbulan et al., 1993) (Dantzer et al., 1998) ainsi qu'avec un complexe de réplication multiprotéique contenant notamment les ADN polymérases α et δ , des hélicases, des topoisomérases ainsi que PCNA (Simbulan-Rosenthal et al., 1996). Parmi ces protéines, beaucoup sont hétéromodifiées par PARP-1, et une implication de cette modification dans le contrôle de la progression des fourches de réplication sur un ADN endommagé a été proposée (Dantzer et al., 1998). Cette idée se voit confortée par l'observation de l'interaction entre PARP-1 et p21^{waf1/cip1}, la protéine du point de contrôle de la phase G1 du cycle cellulaire (Frouin et al., 2003) ainsi qu'avec l'hélicase Werner (WRN) (Adelfalk et al., 2003) (Lebel et al., 2003), protéine du complexe répliatif qui semble être impliquée dans la prise en charge des dommages de l'ADN au cours de la réplication. Son absence entraîne le syndrome de Werner caractérisé par une instabilité

génomique (Bachrati and Hickson, 2003). WRN en retour semble stimuler l'activité d'hétéromodification par PARP-1 en réponse aux dommages de l'ADN (von Kobbe et al., 2003). Enfin, PARP-1 est nécessaire au redémarrage des fourches de réplication après endommagement de l'ADN (Yang et al., 2004). Toutes ces observations permettent de suggérer une implication de PARP-1 à l'intersection des mécanismes de la réparation et de la réplication de l'ADN.

4) Le catabolisme du PAR, la poly(ADP-ribose)glycohydrolase

Le poly(ADP-ribose) synthétisé par les PARP assure de nombreuses fonctions de signalisation et de recrutement au sein de la cellule. Mais à ce titre, le signal représenté par le PAR doit être dynamique, modulable et réversible. Le PAR doit donc pouvoir être dégradé après sa synthèse. On constate effectivement que, dans la majorité des cas, le temps de vie du PAR est court, de l'ordre de 15 minutes dans le cas du SSBR. La poly(ADP-ribose)glycohydrolase (PARG) est l'enzyme chargée de la dégradation du PAR, grâce à ses activités exo- et endoglycosidase qui lui permettent d'hydrolyser les liaisons glycosidiques entre les unités d'ADP-ribose (figure 13a). Chez les mammifères, plusieurs PARG isoformes ont été décrites, codées par le même gène. Ainsi, en plus de la protéine nucléaire de 110kDa et de la forme mitochondriale de 65kDa, des variants d'épissage alternatif dépourvus de l'exon 1 (PARG de 102 kDa) ou des exons 1 et 2 (PARG de 99 kDa) ont été décrits (Meyer-Ficca et al., 2004). Les rôles et les localisations cellulaires de ces différentes protéines isoformes ne sont pas encore très bien connus. L'absence d'inhibiteur spécifique et biodisponible de la PARG utilisable sur des cellules a longtemps été un frein à la compréhension des rôles biologiques de la PARG. Des approches par disruption de gène ou par déplétion de la protéine par ARN interférence ont donc été mises en œuvre. Les souris homozygotes pour la délétion de l'exon 4 du gène encodant la PARG, délétion entraînant une disparition totale de toutes les formes de PARG, meurent dès le jour 3,5 de vie embryonnaire, suite à la mort cellulaire par apoptose induite par l'accumulation de PAR (Koh et al., 2004). De manière similaire, une mutation invalidant le gène de la PARG chez la drosophile conduit à une mortalité élevée associée à une dégénération neuronale induite par l'accumulation de PAR dès le stade larvaire (Hanai et al., 2004). De plus, PARG semble être nécessaire au bon déroulement de la réparation des cassures simple-brin de l'ADN et les cellules traitées par

Introduction

ARN interférence ciblant la PARG présentent une cinétique de réparation de ces cassures anormalement lente (Fisher et al., 2007). Par ailleurs, il est intéressant de noter que PARG semble interagir avec PARP-1 et XRCC1, et que ces interactions pourraient réguler le choix de la voie de mort cellulaire après traitement par l'agent alkylant MNNG (Keil et al., 2006). Les niveaux de PAR dans les cellules dépendent donc non seulement de PARP-1 et de PARG, mais aussi des interactions entre ces protéines et certains facteurs de la réparation des lésions de l'ADN, et la régulation complexe qui en résulte influencerait fortement le devenir de la cellule.

III. La réplication de l'ADN chez les eucaryotes

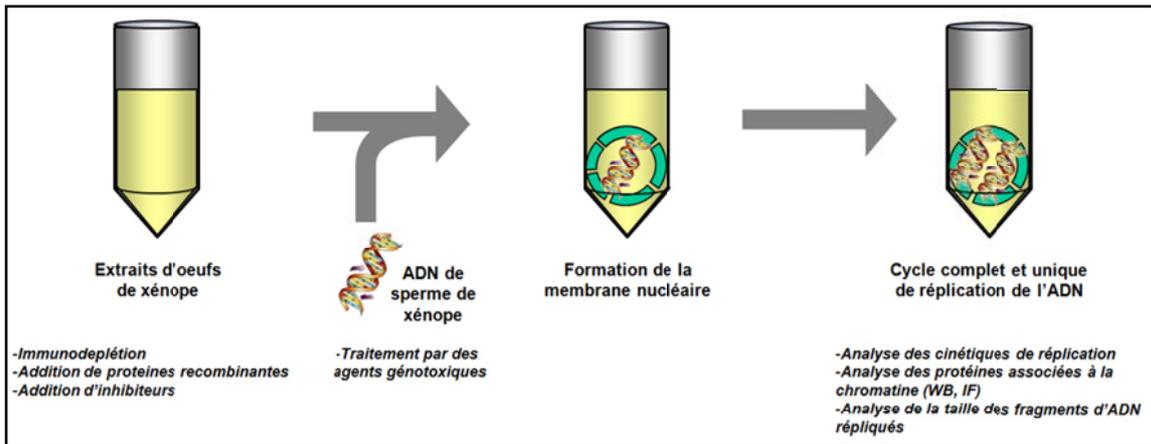
1. Le mécanisme de la réplication

La molécule double-brin d'ADN est le support de toute l'information génétique nécessaire à la vie de la cellule. Cette information doit être dupliquée fidèlement et efficacement avant que la cellule ne se divise, afin de transmettre un patrimoine intact aux cellules filles. La réplication de l'ADN fait appel à un grand nombre de facteurs différents, et peut-être divisée en deux phases majeures : l'initiation et l'élongation.

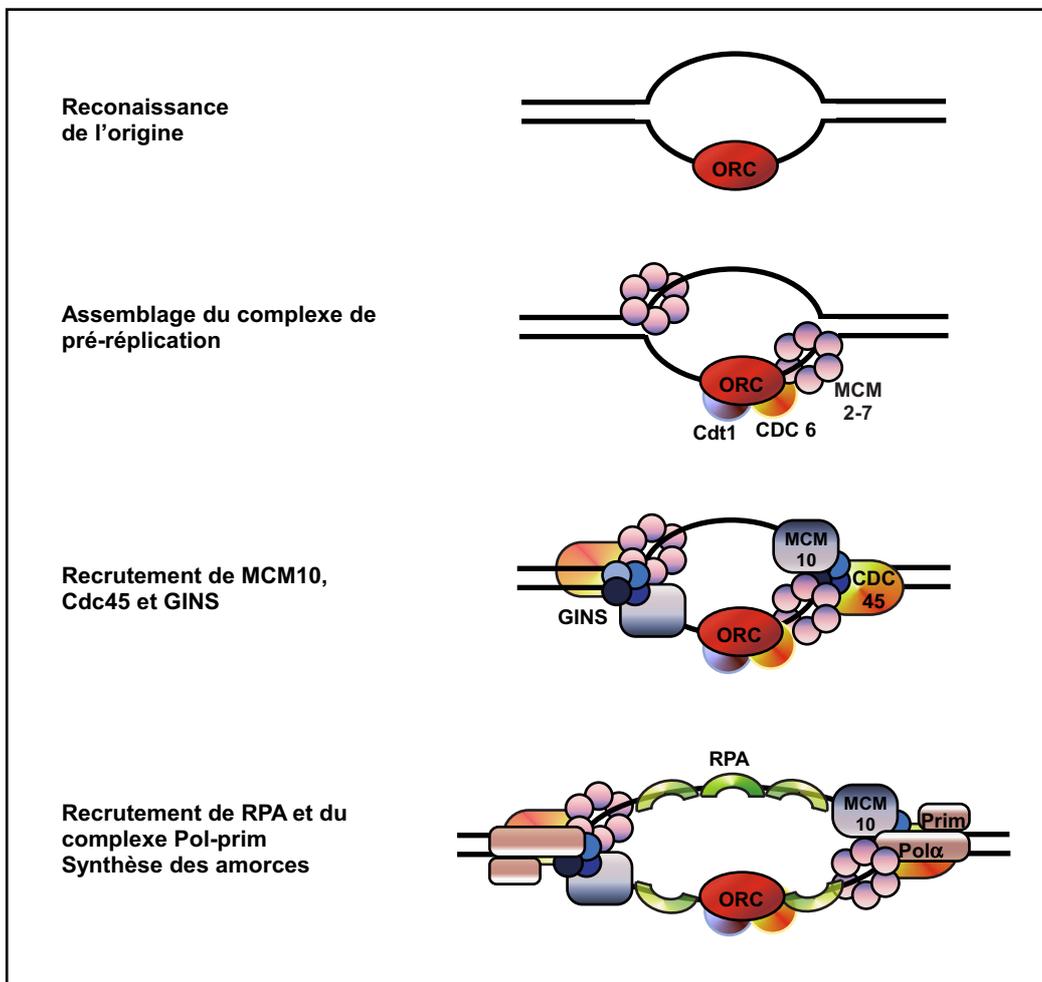
A) L'initiation de la réplication

De grandes avancées dans la compréhension des mécanismes de l'initiation de la réplication ont été faites les dernières années grâce aux expériences utilisant le système de réplication en extraits d'œuf de *Xenopus laevis*. Ce système repose sur la particularité des extraits protéiques d'ovocytes de ce batracien qui catalysent un cycle de réplication complet et unique du matériel génétique lorsqu'ils sont incubés avec un ADN (typiquement de la chromatine de sperme de xénope). L'aspect acellulaire de ce système permet l'addition de molécules exogènes (protéines, inhibiteurs) ainsi que le retrait de protéines par immunodéplétion. Ainsi l'étude des rôles individuels de chaque protéine au sein de la réplication est possible et plus aisée qu'avec d'autres systèmes (figure 15a).

L'initiation de la réplication a pour but de mettre en place tous les éléments qui permettront à l'élongation de la réplication et aux facteurs qui y sont associés de remplir leur fonction. Elle comprend la reconnaissance des origines de réplication par les protéines du complexe de pré-réplication, le remaniement local de la structure de la chromatine par les facteurs de pré-initiation, et enfin la synthèse des amorces d'ARN qui servent de base à la réplication proprement dite (figure 15b).



a) Système d'étude de la réplication de l'ADN dans les extraits d'oeufs de xénope



b) Différentes étapes de l'initiation de la réplication de l'ADN

Figure 15 : Initiation de la réplication chez les eucaryotes

1) Les origines de réplication

La réplication dans les cellules eucaryotes débute au niveau de zones spécifiques de la chromatine, les origines de réplication. Ces origines sont réparties le long du génome afin de permettre le bon avancement de la réplication dans le temps, mais leur structure varie considérablement selon les espèces (Bell and Dutta, 2002). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les origines sont bien déterminées, associées à des portions d'ADN d'environ 150 paires de bases, et sont initiées dans un ordre précis et reproductible (Theis and Newlon, 2001). A l'inverse, chez le batracien *Xenopus*, la fixation des protéines de l'initiation n'est pas spécifique d'une séquence d'ADN, et la répartition des origines le long du génome semble être simplement liée à leur espacement les unes par rapport aux autres (Blow, 2001).

2) La reconnaissance des origines de réplication

Malgré la grande diversité de séquence et de structure des origines de réplication entre les différentes espèces, tous les eucaryotes utilisent la même palette principale de protéines pour initier la réplication (Bell and Dutta, 2002). Le complexe protéique fondamental dans la définition des origines de réplication sur l'ADN est le complexe de reconnaissance des origines (ORC). Il est conservé chez tous les eucaryotes, ainsi que chez les archaebactéries, est formé de six sous-unités (Orc1 à Orc6) (Bell and Dutta, 2002) et reste associé aux origines tout au long du cycle cellulaire (Bell and Stillman, 1992). C'est lui qui sert de plateforme de recrutement pour les facteurs du complexe de pré-réplication (figure 15b).

3) Le complexe de pré-réplication

Les facteurs de pré-réplication qui sont recrutés sur la chromatine après ORC, au cours de l'amorçage des origines de réplication en phase G1 du cycle cellulaire, sont l'ATPase Cdc6, Cdt1 et la protéine géminine (Bell and Dutta, 2002) (Lutzmann et al., 2006). Cdc6 et Cdt1 vont ensuite permettre le recrutement du complexe MCM (Mini-Chromosome Maintenance) (Perkins and Diffley, 1998) (Jang et al., 2001), un complexe hexamérique annulaire formé des protéines MCM2 à MCM7 (Fujita et al., 1997) (Maiorano et al., 2006) présentant une activité hélicase (Ishimi, 1997). Enfin la protéine géminine associée à Cdt1 peut inhiber celle-ci afin

d'empêcher le recrutement prématuré du complexe MCM ainsi que la ré-initiation des origines au cours d'un même cycle cellulaire (Lutzmann et al., 2006).

4) L'activation des origines de réplication

Une fois le complexe MCM chargé sur la chromatine, l'origine de réplication peut être activée sous forme d'un complexe d'initiation. Cette étape se fait sous le contrôle de deux kinases régulées par le cycle cellulaire, Cdc7 et Cdk2. Cdc7 est associé à une sous-unité régulatrice, Dfb4, qui restreint son activité à la phase S du cycle cellulaire (Jackson et al., 1993). La phosphorylation du complexe MCM par Cdc7 et Cdk2 va permettre son association avec le facteur Cdc45 (Zou et al., 1997) (Sheu and Stillman, 2006) (Walter, 2000). Suite à sa phosphorylation et de son association à Cdc45, le complexe MCM est activé et son activité hélicase permet l'ouverture locale de la double hélice d'ADN (Masuda et al., 2003) (Pacek and Walter, 2004). Le complexe hétérotétramérique GINS est recruté conjointement à Cdc45. Ce complexe interagit avec les MCM et stimule leur activité hélicase (Moyer et al., 2006). La portion d'ADN simple-brin ainsi dégagée est alors recouverte par RPA (Walter and Newport, 2000). Enfin, le complexe hétéro-tétramérique ADN polymérase α / primase (Pol-prim) est recruté sur l'origine de réplication, notamment grâce à son affinité pour Cdc45 (Uchiyama et al., 2001) et pour MCM10, facteur de la famille MCM, recruté sur la chromatine peu avant Cdc45 (Ricke and Bielinsky, 2004) (Sawyer et al., 2004). De plus, cette fixation est vraisemblablement favorisée par l'interaction entre Pol-prim et l'hétéro-tétramère GINS qui stimule son activité primase (De Falco et al., 2007) (figure 15b). La primase, comprenant deux des sous-unités du complexe Pol-prim (voir plus loin la partie décrivant l'ADN primase), va alors synthétiser une courte amorce d'ARN formée de 8 à 12 ribonucléotides qui sera allongée d'une vingtaine de désoxyribonucléotides par l'ADN Pol α (Arezi and Kuchta, 2000). La synthèse de ce duplexe ARN/ADN sert d'amorce à la synthèse des nouveaux brins d'ADN. Du fait de la nature antiparallèle de la double hélice d'ADN, et du sens de fonctionnement 5' \rightarrow 3' des ADN polymérases, un des deux brins est dupliqué en continu avec une seule amorce à son départ tandis que la réplication du deuxième brin se fait de manière discontinue, par portions d'environ 200 bases (Toueille and Hubscher, 2004). Ces segments d'ADN sont appelés fragments d'Okazaki, du nom du scientifique qui évoqua la première fois la possibilité d'une synthèse discontinue d'ADN (Okazaki et al., 1968). Ils

débutent chacun par une amorce d'ARN/ADN d'une trentaine de nucléotides synthétisée par le complexe Pol-prim.

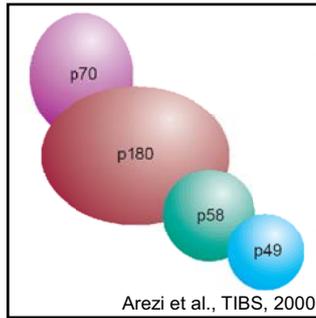
B) Le complexe ADN polymérase α -primase

Une caractéristique fondamentale commune à toutes les ADN polymérases est leur impossibilité d'initier la synthèse de nouveaux brins d'ADN *de novo* sur une matrice simple-brin. Ces enzymes ont absolument besoin de l'extrémité 3' d'un brin initiateur préexistant, le « primer », afin de pouvoir se lier à l'ADN matrice. Une enzyme spécialisée est donc requise pour synthétiser ce court fragment d'ARN qui sera ensuite élongé par les ADN polymérases : la primase.

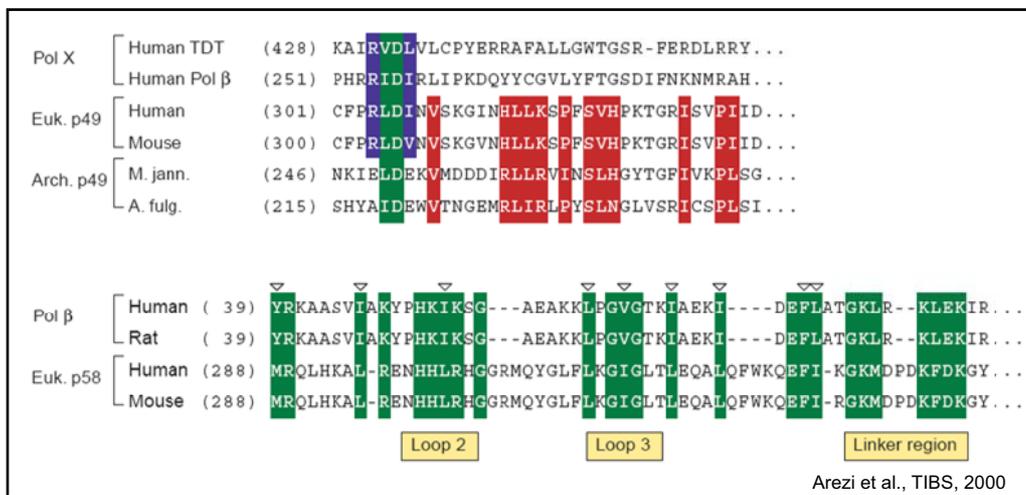
1) Structure et fonction de la primase

Chez les eucaryotes, l'initiation de la synthèse de tout nouvel ADN fait appel à la synthèse par la primase d'un brin initiateur d'ARN de 8 à 12 nucléotides de long. Pol α allonge ensuite cette amorce d'ARN par une vingtaine de désoxyribonucléotides. La primase est une polymérase extrêmement peu fidèle. Elle intègre jusqu'à 30 % de nucléotides incorrects, et parfois même plusieurs nucléotides incorrects à la suite. Cette infidélité n'est toutefois pas un danger pour la cellule puisque les amorces d'ARN sont ensuite dégradées lors de la maturation des fragments d'Okazaki (Sheaff and Kuchta, 1994). Une fois l'amorce ARN/ADN synthétisée, Pol α se dissocie et laisse les polymérases répliquatives Pol δ et Pol ϵ prendre la relève (Waga and Stillman, 1998). La primase, quant à elle, semble rester associée à la machinerie répliquative, tant au niveau du brin continu qu'au niveau des fragments d'Okazaki et jouerait ainsi un rôle de frein moléculaire à l'avancement rapide de la répllication du brin continu afin d'éviter un découplage par rapport à la synthèse des fragments d'Okazaki beaucoup plus lente (Lee et al., 2006).

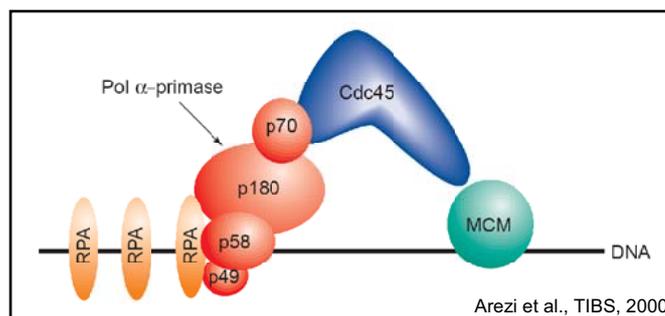
L'activité du complexe Pol α -primase est par ailleurs indispensable au maintien de l'intégrité des télomères pendant la répllication. Les télomères sont des séquences répétitives retrouvées aux extrémités des chromosomes, protégeant ces derniers de l'attaque de nucléases



a) Représentation schématique de l'ADN polymérase α -primase. Les sous-unités p48 et p58 forment la primase, la sous-unité p180 est l'ADN polymérase α .



b) Alignements de séquence entre p48, p58 et Pol β : p48 présente des homologies avec les site catalytique de Pol β p58 présente des homologies avec le domaine 8 kDA de Pol β



c) Représentation schématique des interactions protéiques entre Pol α -primase et la machinerie réplivative

Figure 16 : Complexe ADN polymérase α -primase : Structure et interactions

par la formation de structures secondaires particulières. Au cours de leur élongation, la télomérase génère tout d'abord le brin continu en polymérisant de multiples répétitions des séquences télomériques, puis Pol α -primase et Pol δ convertissent cet ADN simple brin en ADN double-brin.

Le complexe Pol-prim est formé de 4 sous-unités (figure 16a). Deux de ces sous-unités forment la primase : p48, sous unité catalytique de 48 kDa, et p58, sous unité régulatrice de 58 kDa. Pol α est une protéine de 180 kDa, p180. Le complexe Pol-prim contient une quatrième sous unité dont la masse moléculaire varie entre 68 et 90 kDa selon l'organisme (nommée ici p70), fortement liée à Pol α et nécessaire à sa translocation vers le noyau de la cellule (Mizuno et al., 1998).

Les deux sous-unités de la primase sont très fortement associées entre elles et des résidus situés aux extrémités N- et C-terminale de p58 sont impliqués dans cette interaction (Copeland, 1997). La sous-unité p58 contient un signal de localisation nucléaire (aa 6 à 12) qui permet de diriger p58 ainsi que le dimère p48-p58 vers le noyau (Mizuno et al., 1996). La protéine p48, sous-unité catalytique de la primase, peut se lier aux ADN simple-brin et ainsi catalyser la formation de liaisons phosphodiester. En absence de p58, p48 est capable de synthétiser des amorces d'ARN mais de manière beaucoup moins efficace. L'association de p48 seule à l'ADN est aussi beaucoup moins stable que celle du dimère p48-p58 (Schneider et al., 1998). La sous-unité p58 a donc pour fonction de stabiliser p48. Elle présente une forte affinité pour les ADN simple-brin ainsi que pour les duplexes ADN/ARN synthétisés lors de l'initiation (Arezi et al., 1999). Elle interagit par ailleurs avec la sous-unité p180 et forme ainsi le lien entre p48 et Pol α . Des études par mutagenèse ont montré que le domaine de p58 homologue au domaine 8 kDa de Pol β est nécessaire à l'initiation et à l'élongation de l'amorce d'ARN, ainsi qu'à sa translocation vers Pol α (Zerbe and Kuchta, 2002). Ainsi une fois l'amorce d'ARN synthétisée par p48, p58 peut transférer l'ADN substrat vers p180 où l'amorce est élonguée grâce à l'activité ADN polymérase de cette dernière (Copeland and Wang, 1993).

L'analyse de la séquence des deux sous-unités de la primase a montré des homologies avec les protéines de la classe X de la famille des nucleotidyl-transferases, dont Pol β fait partie (voir figure 16b). Pol β est impliquée dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN, et elle comprend deux domaines distincts : un domaine 31 kDa qui contient son

activité phosphodiesterase et un domaine 8 kDa qui présente une activité ribose-phosphate lyase. On constate que la séquence de p48 présente des homologies avec le site catalytique du domaine 31kDa de Pol β , alors que p58 présente des similarités avec le domaine 8 kDa de Pol β (Arezi and Kuchta, 2000) (Kirk and Kuchta, 1999). Ces homologies de séquence entre p48-p58 et Pol β laissent penser que les deux unités de la primase forment vraiment un complexe étroitement lié dont les fonctions se complètent. Il est probable que la primase adopte une structure en forme de « main » similaire à celle de Pol β , la partie inférieure, la paume étant formée par la sous-unité catalytique, les doigts et le pouce étant formés par p58, formant le fond et les cotés du canal de liaison à l'ADN, respectivement (Arezi and Kuchta, 2000).

2) Les partenaires du complexe Pol α -primase

Il est communément admis que la machinerie répliquative au niveau des fourches de réplication implique de larges complexes multiprotéiques. Pol α -primase conformément à cette idée interagit avec un grand nombre de protéines. Les interactions entre ce complexe et MCM10 (Sawyer et al., 2004) ainsi que son affinité pour le complexe GINS (De Falco et al., 2007) favorise son recrutement au niveau des origines de réplifications. Le complexe Pol α -primase interagit aussi avec Cdc45 *via* sa sous-unité p70 (Kukimoto et al., 1999), avec RPA *via* ses sous-unités p48, p58 et p180 (Dornreiter et al., 1992) (Braun et al., 1997) (Arezi and Kuchta, 2000) et avec l'antigène T de SV40 par ses quatre sous-unités (Dornreiter et al., 1992) (Weisshart et al., 2000) (figure 16c). Ces interactions ont un rôle majeur dans la régulation de l'activité de pol α -primase lors de l'initiation de la réplication (Braun et al., 1997).

3) Le rôle de la primase dans la réparation de l'ADN et les points de contrôle du cycle cellulaire

La primase semble être un élément essentiel dans le couplage de la réplication aux mécanismes de réparation des dommages et de signalisation des lésions de l'ADN.

Pol α -primase interagit avec PARP-1 qui est à l'initiation de la réponse cellulaire aux cassures simple-brin de l'ADN. En revanche, aucune association entre PARP-1 et la primase

Polymérase	Gène (sous-unité catalytique)	Rôle
Famille A		
Pol γ	POLG1	Réplication (ADN mitochondrial)
Pol ν	POLN	Réparation ?
Pol θ	POLQ	Réparation des crosslinking
Famille B		
Pol α	POLA1	Réplication Initiation
Pol δ	POLD1	Réplication Elongation
Pol ϵ	POLE	Réplication Elongation
Pol ζ	REV3L	Réplication Translésionnelle
Famille X		
Pol β	POLB	Réparation BER/SSBR
Pol λ	POLL	Réparation NHEJ
Pol μ	POLM	Réparation NHEJ
Pol σ	POLS (trf4)	Réparation ?
Famille Y		
Pol η	POLH	Réplication Translésionnelle
Pol κ	POLK (hDinB)	Réplication Translésionnelle
Pol ι	POLI	Réplication Translésionnelle
Rev 1	REV1L	Réplication Translésionnelle

Tableau 2 : Les principales ADN polymérases humaines

p48-p58 n'avait encore été démontrée. PARP-1 et Pol α sont associées au niveau des fourches de réplication (Dantzer et al., 1998) et la poly(ADP-ribosyl)ation de Pol α par PARP-1 inhibe son activité *in vitro* (Eki, 1994). Cette interaction pourrait être la base d'une coordination entre un arrêt de la réplication et la réparation des lésions de l'ADN.

Par ailleurs, chez *S.cerevisiae*, la mutation du gène codant pour p48 abolit le délai d'entrée en phase S après traitement par des agents génotoxiques. De plus, la combinaison de cette mutation avec celle de protéines des points de contrôle du cycle cellulaire induit la mort cellulaire (Marini et al., 1997). Il a aussi été montré que la synthèse des amorces d'ARN par la primase est nécessaire au déclenchement du point de contrôle de la réplication de l'ADN mais que l'activité de Pol α n'est pas indispensable (Michael et al., 2000).

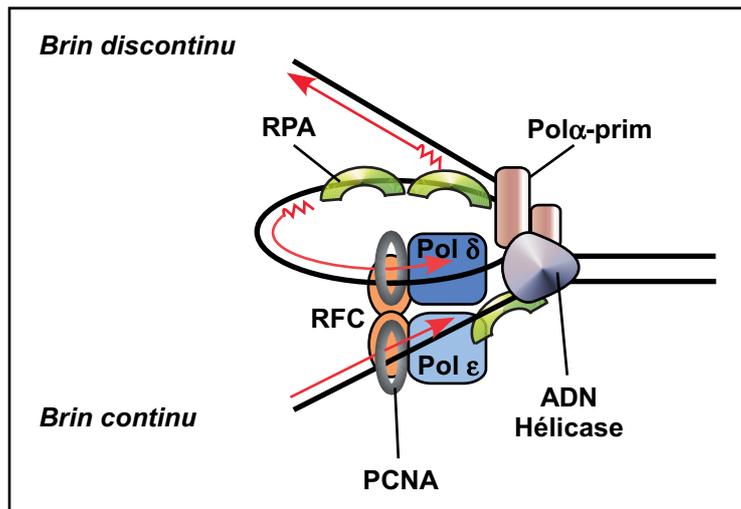
L'activité primase est donc essentielle au déclenchement du point de contrôle de la réplication, mais on ne possède pas à ce jour de preuve montrant la régulation de l'activité primase en réponse aux dommages de l'ADN. Cette régulation pourrait se faire de deux manières, soit par modification post-traductionnelle (phosphorylation, poly(ADP-ribosyl)ation), soit par interaction avec d'autres protéines.

C) L'élongation des brins d'ADN

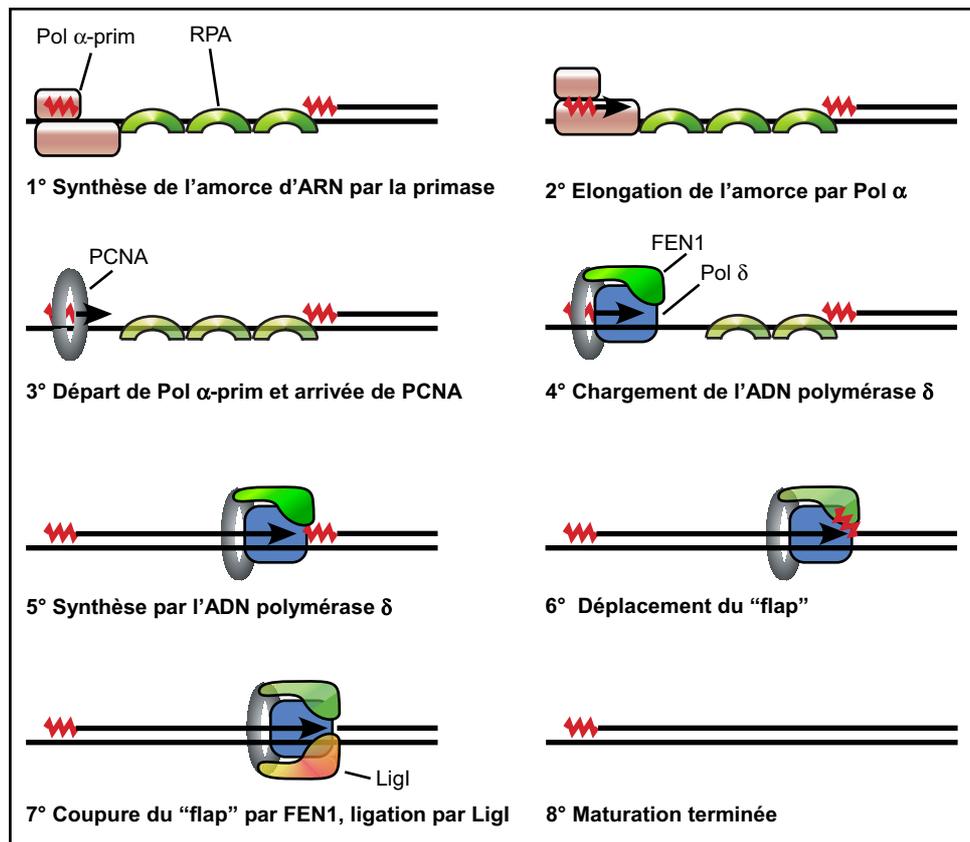
La majorité des connaissances dont on dispose à ce jour sur l'organisation de la machinerie réplivative au niveau de la fourche de réplication chez les eucaryotes ont été apportées par l'étude *in vitro et in vivo* de la réplication de plasmides portant l'origine de réplication SV40 *ori* du virus simien SV40. La réplication de l'ADN dans le système SV40 requiert une unique protéine virale, l'antigène tumoral T qui y assume le double rôle de protéine initiatrice en fixant l'origine de réplication SV40 *ori*, et d'hélicase au niveau de la fourche de réplication (Wobbe et al., 1985).

1) L'échange d'ADN polymérase

Une fois l'amorce d'ARN/ADN synthétisée par le complexe Pol-prim, une autre polymérase doit prendre le relais car la polymérase α n'est pas une polymérase processive et fidèle. Chez les eucaryotes, deux enzymes sont impliquées dans l'élongation des brins d'ADN



a) Modèle de la machinerie répliquative à la fourche de répllication - Elongation des brins d'ADN



b) Représentation schématique des différentes étapes de la maturation des fragments d'Okazaki

Figure 17 : Elongation des brins d'ADN et maturation des fragments d'Okazaki

au cours de la réplication : les ADN polymérases δ et ϵ (Pol δ et Pol ϵ) (Burgers, 1998) (tableau 2). L'échange entre Pol α et Pol δ/ϵ se fait à la fin de l'initiation du brin continu (Tsurimoto et al., 1990) ainsi que lors de la synthèse de chaque fragment d'Okazaki (Waga and Stillman, 1994). Le mécanisme d'échange de polymérase est très similaire entre la synthèse du brin continu et celle des fragments d'Okazaki. L'extrémité 3' de l'amorce d'ARN/ADN synthétisée par Pol-prim est reconnue par le facteur de réplication C (RFC) déplaçant ainsi Pol α du brin d'ADN matrice. Ensuite l'amorce est reconnue par l'homotrimère PCNA associé à Pol δ/ϵ qui prennent le relai sur le brin matrice (Tsurimoto and Stillman, 1991) (Waga and Stillman, 1994). PCNA joue ici un rôle d'anneau de processivité, c'est-à-dire qu'associé à l'ADN polymérase, il lui permet de répliquer de grands fragments d'ADN, de l'ordre de 5-10 kb sur le brin continu. Au niveau du brin discontinu, la polymérase poursuit l'élongation du brin d'ADN jusqu'à la rencontre du fragment d'Okazaki précédemment synthétisé (Waga and Stillman, 1998) (figure 17a).

Pol ϵ est une enzyme très proche de Pol δ et n'est pas requise pour la réplication de l'ADN *in vitro* dans le système SV40 (Zlotkin et al., 1996). En revanche cette enzyme est indispensable au bon déroulement de la réplication de l'ADN chromosomique *in vivo* (Morrison et al., 1990) (Araki et al., 1992). Au cours de la réplication de l'ADN chromosomique, ces deux polymérases pourraient donc avoir des rôles distincts, et il a été suggéré que Pol ϵ pourrait être responsable de la synthèse du brin continu d'ADN tandis que Pol δ serait impliquée plus spécifiquement dans la synthèse des fragments d'Okazaki (Johnson and O'Donnell, 2005) (Pursell et al., 2007) (figure 17a).

2) La maturation des fragments d'Okazaki

La maturation des fragments d'Okazaki comprend deux étapes principales : l'élimination des amorces d'ARN, puis la ligation des fragments adjacents (figure 17b). Cette maturation est un phénomène qui nécessite une précision et une efficacité extrême. En effet, à chaque cycle de réplication de son génôme, la cellule eucaryote synthétise plusieurs millions de fragments d'Okazaki. Si la ligation de ces fragments n'est pas parfaite, les cassures simple-brin en résultant peuvent entraîner, lors du cycle cellulaire suivant, l'apparition de cassures double-brin hautement génotoxiques pour la cellule (Garg and Burgers, 2005a). La maturation des fragments d'Okasaki repose donc sur l'interaction et la coordination entre Pol δ , FEN1 et

LigI. L'absence d'interaction entre Pol ϵ et FEN1 est sûrement une des raisons pour laquelle cette polymérase n'est pas impliquée dans la synthèse des fragments d'Okazaki. Une fois arrivée au contact de l'amorce d'ARN du fragment d'Okazaki suivant, Pol δ va déplacer localement le brin néo-synthétisé et remplacer l'amorce d'ARN par de l'ADN. Dans la majorité des cas, les fragments d'ADN déplacés (flap) sont courts et vont être la cible de clivages successifs par FEN1. Par contre, dans une petite proportion des cas (non représentée sur la figure 17b), le fragment d'ADN simple-brin déplacé est suffisamment long pour pouvoir être recouvert par RPA, ce qui inhibe FEN1. La cellule a alors recours à une autre enzyme, Dna2, qui coupe une fraction du fragment d'ADN en laissant une petite partie qui sera ultérieurement éliminée par FEN1. La jonction entre les deux fragments d'Okasaki adjacents est alors effectuée par LigI (Garg et al., 2004; Rossi and Bambara, 2006).

3) L'hélicase réplivative

La nature de l'ADN hélicase associée aux polymérases δ/ϵ lors de l'élongation des brins d'ADN est encore assez mystérieuse. Le complexe MCM2-7 est évidemment un bon candidat, mais récemment de nouvelles protéines possédant une activité hélicase ont été identifiées. Ainsi MCM8, un nouveau membre de la famille MCM proche des MCM2-7 est retrouvé associé au complexe de pré-réplication et présente des activités ATPase et hélicase (Maiorano et al., 2006). Un autre facteur potentiellement impliqué dans l'ouverture de la double hélice d'ADN dans cette phase de la réplication est l'hélicase RECQL4. Cette protéine est mutée dans le syndrome rare de Rothmund-Thomson, une maladie caractérisée par une fragilité chromosomique, un développement anormal et une prédisposition au cancer (Kitao et al., 1999). Cette enzyme est nécessaire au chargement de RPA au niveau des origines de réplication (Sangrithi et al., 2005) et présente une activité hélicase qui pourrait être mise en jeu lors de la réplication (Hickson, 2003). Dans l'ensemble, l'élongation des brins d'ADN au cours de la réplication ne semble pas faire appel à une hélicase exclusive, mais plutôt à plusieurs hélicases différentes dont les rôles seraient soit conjoints, soit redondants.

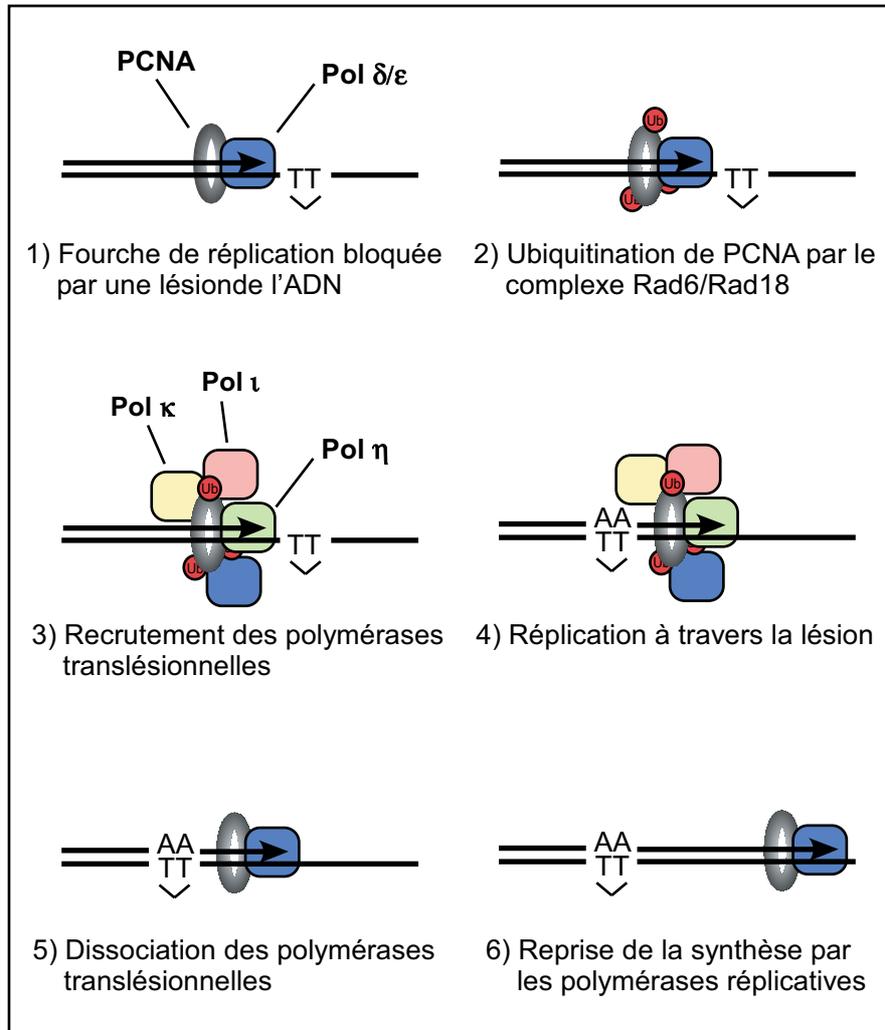


Figure 18 : Différentes étapes de la réplication translésionnelle

1) La réplication translésionnelle

Les lésions présentes sur l'ADN constituent un obstacle majeur à l'avancement des fourches de réplication. La collision entre la machinerie répliquative et une lésion de l'ADN peut bloquer son avancement, et aussi entraîner l'apparition de cassures dans l'ADN (voir les chapitres consacrés aux voies de réparation des lésions de l'ADN). Néanmoins, la cellule a développé des mécanismes pour permettre à la réplication de passer à travers certains types de lésions : la synthèse translésionnelle (TLS) (figure 18).

A) Les polymérases translésionnelles

Les ADN polymérases humaines sont regroupées en différentes classes en fonction d'homologies de leurs séquences (tableau 2). Les polymérases répliquatives classiques de la famille B sont capable de répliquer un ADN matrice avec une grande rapidité et une grande fidélité nécessaire à la duplication fidèle du matériel génétique au cours de la phase S du cycle cellulaire. Cette fidélité d'incorporation des nucléotides est basée sur la grande précision et rigidité du site catalytique de ces polymérases qui contrôlent l'exactitude du nucléotide incorporé en face de celui situé sur le brin matrice, selon les règles de Watson-Crick. De plus, la présence d'une activité exonucléase 3' → 5' en plus de leur activité polymérase permet le retrait éventuel d'un nucléotide qui aurait été mal incorporé dans un mécanisme de « proofreading » (Lehmann, 2006).

Les polymérases de la famille Y forment une famille à part, caractérisée par leur faible processivité et leur faible fidélité d'incorporation des nucléotides ainsi que par l'absence d'activité de « proofreading » à l'inverse de ces polymérases répliquatives classiques. Leur site catalytique plus ouvert et moins rigide ne contrôle pas strictement la nature du nucléotide inséré, mais tolère en contrepartie la présence de structures particulières ou de distorsions sur la molécule d'ADN (Trincao et al., 2001). Ces polymérases permettent ainsi à la fourche de réplication de passer à travers certains types de lésions de l'ADN. Chaque polymérase de la famille Y possède des caractéristiques propres qui les rendent plus ou moins spécifiques de l'incorporation d'un nucléotide en face d'un type de lésion donné (Ohmori et al., 2001).

L'ADN polymérase η (Pol η) est la polymérase translésionnelle la mieux connue à ce jour. Elle est absente ou mutée chez les patients atteints d'une forme variante de la maladie Xeroderma pigmentosum (XPV). Il a été montré que les formes majoritaires de cette maladie sont liées à un défaut de NER (voir plus haut, le chapitre consacré à cette voie de réparation), mais 20% des patients présentant des symptômes similaires (prédisposition aux cancers de la peau, hypermutabilité des cellules exposées aux rayonnements UV) n'ont pas de mutation dans les gènes codant pour les protéines de la famille XP. Le gène déficient chez les patients XPV code pour Pol η (Masutani et al., 1999a), polymérase qui est capable de répliquer l'ADN à travers les lésions de type CPD, majoritairement induites par les rayonnements UV (figure 1 et 2c), en insérant les bases correctes en face de la lésion dans plus de 90% des cas (Masutani et al., 2000). Du fait de sa très faible processivité, Pol η se dissocie vraisemblablement peu après avoir dépassé la zone endommagée de l'ADN, et ce sont les polymérases classiques et fidèles qui reprennent alors une synthèse d'ADN fidèle, ce qui est préférable au regard de la faible fidélité de Pol η sur un ADN non endommagé (McCulloch et al., 2004) (figure 18).

Le 6-4 photoproduit, un autre type de lésion induit par les UV, entraîne une distorsion de la molécule d'ADN bien plus grande que le CPD (figure 2ter) et bloque la fourche de réplication même avec Pol η . Il a été démontré que Pol η est impliquée dans une incorporation mutagène en face des lésions de type (6-4)TT (Bresson and Fuchs, 2002). D'autres études menées chez la levure et sur des cellules humaines ont montré que Rev1 et l'ADN polymérase ζ (Pol ζ), une polymérase de la famille B formée des deux sous-unités Rev3 (catalytique) et Rev7 (régulatrice), sont requises pour la TLS à travers ce type de lésions, sans que le mécanisme soit connu (Gibbs et al., 2005). Rev1 est une protéine énigmatique. Ce n'est pas réellement une ADN polymérase, mais une dCMP transférase qui peut insérer un résidu dCMP en fonction de la séquence du brin d'ADN matrice (Nelson et al., 1996). Ainsi la réplication des CPD (dimères de thymine) ne fait-elle pas appel à Rev1, car elle ne nécessite pas d'incorporation de cytosine. En revanche la réplication à travers les 6-4 photoproduits ou les sites abasiques peut mettre en jeu les protéines Rev1/Pol ζ (Johnson et al., 1998).

Le rôle des autres polymérases translésionnelles est encore peu connu. De nombreuses études *in vitro* utilisant divers ADN endommagés comme substrats ont montré que certaines polymérases sont capables d'insérer un nucléotide en face d'une lésion mais ne sont pas capables de poursuivre la synthèse d'ADN après cette insertion, comme l'ADN polymérase ι

(Pol ι) par exemple (Washington et al., 2004). Inversement, d'autres polymérasas sont peu efficaces pour insérer un nucléotide au niveau d'une zone endommagée de l'ADN, mais peuvent poursuivre la synthèse une fois l'insertion réalisée par une autre polymérase, comme c'est le cas pour l'ADN polymérase κ (Pol κ) (Haracska et al., 2002).

Les mécanismes de TLS nécessitent l'action coordonnée de plusieurs polymérasas translésionnelles différentes afin d'assurer la réplication efficace d'un ADN matrice endommagé. Pour organiser ce ballet d'ADN polymérasas au niveau des lésions de l'ADN, un système organisé de recrutement des différentes polymérasas est nécessaire.

B) Le recrutement des polymérasas translésionnelles

L'anneau de processivité PCNA semble jouer un rôle fondamental dans le mécanisme d'échange de polymérasas lors de la réplication d'un ADN endommagé. Ce complexe homotrimérique associé aux polymérasas réplcatives joue un rôle de plateforme d'accueil pour les différentes polymérasas mises en jeu dans la TLS. Ainsi, lorsque la fourche de réplication est bloquée par une lésion PCNA est modifiée par ubiquitination de sa lysine 164. Cette modification est conduite par l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine Rad6 et l'ubiquitine ligase Rad18 (Hoege et al., 2002).

Les polymérasas translésionnelles Pol η , Pol ι et Pol κ possèdent un domaine PIP d'interaction avec PCNA mais ces interactions sont faibles et ne sont observables qu'*in vitro* (Haracska et al., 2001) (Vidal et al., 2004). La mono-ubiquitination de PCNA permet de renforcer les interactions de PCNA avec les polymérasas translésionnelles et de les observer *in vivo* (Kannouche et al., 2004). Ces polymérasas possèdent un domaine UBD de liaison à l'ubiquitine qui leur permet aussi de se lier fortement à PCNA mono-ubiquitiné (Bienko et al., 2005) (Wood et al., 2007). L'ubiquitination de PCNA permet ainsi le recrutement efficace des polymérasas de la famille Y via leur motifs PIP et UBD et elle est à la base de l'échange de polymérasas lors de la TLS. Cette modification de PCNA n'altère pas ses fonctions d'anneau de processivité dans la réplication d'un ADN non endommagé par l'ADN par Pol δ . En revanche, en présence de sites abasiques sur l'ADN matrice, l'ubiquitination de PCNA stimule fortement la TLS par Pol η et Rev 1 (Garg and Burgers, 2005b). La nature homotrimérique de l'anneau PCNA lui permet de s'associer à plusieurs polymérasas à la fois.

En effet, lors du blocage de la fourche de réplication, l'ubiquitination de PCNA a lieu systématiquement sur ses trois sous-unités (Kannouche et al., 2004). Sur un ADN endommagé, PCNA ubiquitiné peut donc interagir avec diverses polymérases translésionnelles, chacune rentrant en action en fonction du type de lésion présente sur l'ADN matrice, selon le modèle de la « ceinture à outils » (Pages and Fuchs, 2002) (figure 18).

Une fois la zone endommagée de l'ADN répliquée, les polymérases translésionnelles se dissocient d'elles-mêmes du brin matrice du fait de leur faible processivité, et laissent la place aux polymérases répliquatives classiques plus rapides et fidèles.

IV. Objectifs de mon travail de thèse

XRCC1 est une protéine essentielle à la réparation des cassures simple-brin de l'ADN dans les voies de BER et SSBR et participe aussi à une voie de secours de la recombinaison non-homologue. L'inactivation, chez la souris, du gène codant pour cette protéine entraîne une mortalité embryonnaire précoce. XRCC1 n'a pas d'activité enzymatique connue mais fonctionne comme une plateforme de recrutement et de stimulation pour les différents effecteurs des voies de réparation de l'ADN. Le réseau d'interactions protéiques qu'il organise repose notamment sur ses deux modules BRCT. Le domaine BRCT2 interagit avec l'ADN ligase III α , participe à son recrutement au site du dommage et est à ce titre indispensable au bon déroulement des mécanismes de réparation des cassures simple-brin de l'ADN. Le module BRCT1 interagit avec les protéines PARP-1 et PARP-2 mais ne semble pas nécessaire à la réparation efficace des cassures simple-brin de l'ADN au cours de la phase G1 du cycle cellulaire. En revanche il apparaît comme primordial pour la survie des cellules exposées à des agents alkylants au cours des phases S/G2 du cycle cellulaire.

Afin de mieux comprendre les fonctions du domaine BRCT1 de XRCC1 dans la réparation des dommages de l'ADN au cours des phases S/G2 du cycle cellulaire, nous avons cherché à identifier de nouveaux partenaires de ce domaine et à caractériser ces interactions. Pour cela, notre travail s'est basé sur l'analyse protéomique des protéines d'extraits de cellules HeLa copurifiant avec le domaine BRCT1 de XRCC1 surexprimé dans *E.coli* et

immobilisé sur colonne de GSH-Sépharose. Nous avons ainsi pu identifier deux nouveaux partenaires : la sous unité catalytique de la protéine kinase DNA-PK et la sous unité p58 du complexe ADN polymérase α -primase. Les études des caractéristiques et des rôles physiologiques de ces deux nouvelles interactions constituent les deux parties de mon travail de thèse.

RESULTATS

1^{ère} PARTIE

XRCC1 est phosphorylé par DNA-PK en réponse aux dommages de l'ADN

Introduction

Publication N°1

Discussion des résultats

I. Introduction

La réparation des lésions touchant l'ADN est primordiale pour éviter une instabilité du génome pouvant entraîner le cancer (van Gent et al., 2001) (Hoeijmakers, 2001). La réponse cellulaire face aux cassures simple-brin et double-brin de l'ADN est basée sur la détection et la signalisation efficace de ces lésions, autorisant un recrutement rapide des facteurs de réparation.

XRCC1 agit au cours de la réparation des cassures simple-brin de l'ADN (SSBR) comme une plateforme moléculaire qui coordonne l'assemblage séquentiel des différentes enzymes de réparation au site du dommage. XRCC1 interagit notamment avec la glycosylase OGG1 (Marsin et al., 2003) et l'endonucléase APE1 (Vidal et al., 2001) et stimule l'activité de ces deux enzymes qui sont à l'initiation de la voie de réparation par excision de base, et induisent l'apparition de cassures simple-brin dans l'ADN. XRCC1 interagit aussi avec Pol β (Kubota et al., 1996), responsable de l'incorporation de nucléotides au cours de la réparation des cassures simple-brin de l'ADN, et PNK (Whitehouse et al., 2001) qui est impliquée dans le traitement des extrémités des cassures de l'ADN. L'association entre XRCC1 et PCNA et leur colocalisation au niveau des foyers de réplication relie XRCC1 à la progression de la réplication de l'ADN. La présence de sites de phosphorylation pour CK2 (Loizou et al., 2004) permet de réguler de manière exclusive la fixation de PNK, de l'aprataxine (Gueven et al., 2004), enzyme impliquée dans le traitement des extrémités des cassures simple-brin de l'ADN (Takahashi et al., 2007) (Hirano et al., 2007), ou de Xip1, protéine récemment mise en évidence, dont le rôle est encore peu connu (Bekker-Jensen et al., 2007). Cette fixation différentielle permet ainsi de contrôler la formation de complexes protéiques distincts (Luo et al., 2004).

XRCC1 possède deux modules BRCT qui organisent un réseau d'interaction protéiques important et possèdent des rôles distincts. Le domaine BRCT2 permet l'association entre XRCC1 et l'ADN Ligase III, responsable de la ligation finale de la molécule d'ADN au cours de la réparation des cassures simple-brin de l'ADN, ainsi que la stabilisation de cette dernière (Caldecott et al., 1994) et est ainsi indispensable pour la réparation rapide des cassures simple-brin dans les cellules quiescentes ou en phase G1 du cycle cellulaire (Moore et al., 2000). L'interaction entre le domaine BRCT1 de XRCC1 et les protéines PARP-1 et PARP-2 responsables de la détection des cassures simple-brin de l'ADN entraîne une diminution de

l'activité de poly(ADP-ribosyl)ation de ces deux enzymes (Masson et al., 1998) (Schreiber et al., 2002). Il contient aussi un motif de liaison au poly(ADP-ribose) (Pleschke et al., 2000) qui permet le recrutement rapide de XRCC1 au niveau des lésions de l'ADN après activation de PARP-1 (El-Khamisy et al., 2003) (Schreiber et al., 2006). L'étude de cellules d'ovaire de hamster chinois déficientes pour XRCC1, exprimant des formes mutantes de cette protéine, a permis de montrer que les deux domaines BRCT de XRCC1 ont des rôles indépendants (Kubota and Horiuchi, 2003). Le rôle du domaine BRCT1 est peu connu, mais il apparaît impliqué dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN au cours des phases S/G2 du cycle cellulaire et est requis pour la survie des cellules après traitement par des agents alkylants (Taylor et al., 2002). Afin de mieux comprendre ces mécanismes, nous avons cherché à isoler des nouveaux partenaires du domaine BRCT1 qui pourraient être impliqués spécifiquement dans la réparation des lésions de l'ADN au cours des phases S-G2 du cycle cellulaire.

La sérine/thréonine kinase DNA-PK est une enzyme majeure la réparation des cassures double-brin (DSBR) par recombinaison non-homologue et appartient à la famille des kinases reliées au PI3-kinases. Deux de ses sous-unités, Ku70 et Ku80 sont responsables de la détection de ces lésions et recrutent la sous-unité catalytique DNA-PKcs afin de former l'holoenzyme DNA-PK. DNA-PKcs est activée par son association aux cassures double-brin, et recrute les différents effecteurs chargés du traitement et de la ligation des extrémités de la cassure : la protéine Artemis (Ma et al., 2002) ou le complexe XRCC4/LigIV (Calsou et al., 2003). Le complexe MRE11/Rad50/NBS1 est lui aussi requis au cours de cette voie de réparation dans l'alignement et le traitement des extrémités de la coupure (Nelms et al., 1998) (Huang and Dynan, 2002). PNK enfin, en plus de son rôle dans la réparation des cassures simple-brin, est impliquée dans le traitement des extrémités 5'-OH et 3'-Phosphate des lésions double-brin de l'ADN (Karimi-Busheri et al., 1999)

Nous décrivons dans cet article l'interaction que nous avons mise en évidence entre DNA-PK et XRCC1, se faisant *via* son domaine BRCT1. Ce domaine est phosphorylé par cette kinase au niveau de la sérine 371 en réponse à une exposition aux rayonnements ionisants. En retour, cette interaction stimule l'activité *in vitro* de DNA-PK sur la sérine 15 de p53. La phosphorylation de la sérine 371 régule par ailleurs la transition entre une forme monomère et une forme dimère de XRCC1. Enfin, nous montrons que la forme mutante non

phosphorylable S371L de XRCC1 exprimée dans les cellules CHO EM9 déficientes en XRCC1 ne permet pas de restaurer un défaut de réparation des cassures double-brin observé spontanément ou après exposition aux rayonnements ionisants. Ces résultats nous permettent de proposer que l'interaction entre XRCC1 et DNA-PK joue un rôle dans la résolution des cassures double-brin de l'ADN résultant de la collision entre la machinerie répllicative et les cassures simple-brin au cours de la réplication de l'ADN.

II. Publication n° 1 :

Nicolas Lévy, Adeline Martz, Anne Bresson, Catherine Spenlehauer, Gilbert de Murcia and Josiane Ménissier-de Murcia

XRCC1 is phosphorylated by DNA-PK in response to DNA damage.

Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 1, 32-41.

XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage

Nicolas LÉVY, Adeline MARTZ, Anne BRESSON, Catherine SPENLEHAUER, Gilbert DE MURCIA and Josiane MÉNISSIER-DE MURCIA

Nucleic acids research, 2006, Vol. 34, No. 1, Pages 32-41

Pages 111-120 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj409>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

III. Discussion

A) XRCC1 est associé à DNA-PK in vitro

Dans ce travail, nous montrons une interaction physique et fonctionnelle jusqu'alors insoupçonnée entre le domaine BRCT1 de XRCC1 et l'hétérotrimère DNA-PK, grâce à une combinaison d'immunoprécipitations, de captures GST et de far-western blot. Récemment, Parlanti et al. ont confirmé cette interaction en copurifiant XRCC1 et la kinase DNA-PK au sein d'un même complexe multiprotéique (Parlanti et al., 2007). Cette interaction entre des protéines impliquées dans la réparation des cassures simple-brin (SSBR) et des facteurs de la réparation des cassures-double-brin de l'ADN (DSBR) n'est pas inattendue puisqu'une cassure simple-brin peut être convertie en cassure double-brin par collision avec une fourche de réplication (Kuzminov, 2001b). Par ailleurs, certaines protéines de réparation sont impliquées à la fois dans la réparation des cassures simple- et double-brin de l'ADN. La kinase PNK est ainsi un partenaire de XRCC1 au cours du SSBR (Whitehouse et al., 2001), mais est aussi un acteur important de la voie de DSBR par NHEJ (Chappell et al., 2002). Enfin, XRCC1, LigIII et PARP-1 qui sont trois des acteurs principaux du SSBR sont aussi impliqués dans un mécanisme de secours du NHEJ (Audebert et al., 2004) (Wang et al., 2005), appuyant l'existence d'interconnexions entre ces deux types de mécanismes.

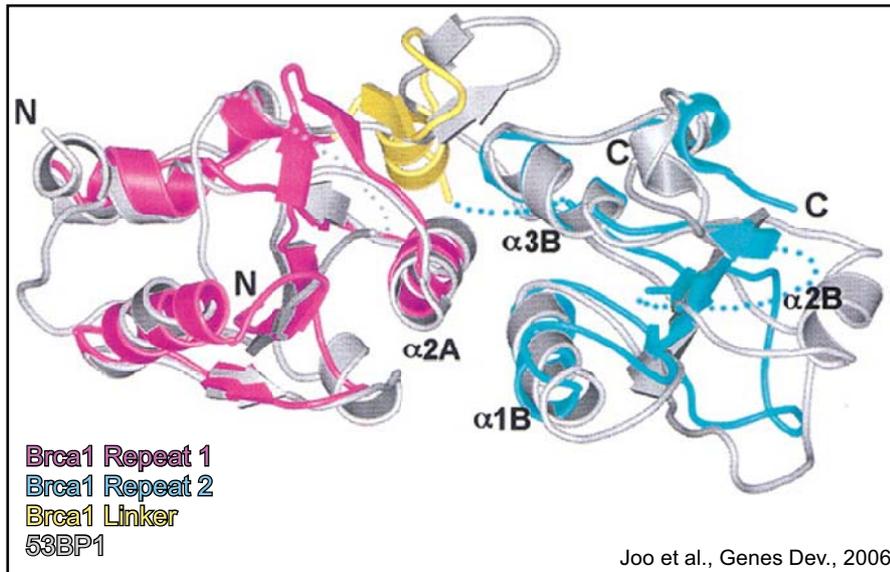
B) Le domaine BRCT1 de XRCC1 est phosphorylé in vivo sur sa sérine 371 par DNA-PK en réponse aux rayonnements ionisants

Différents domaines de XRCC1 ont été exprimés en fusion avec la GST dans des cellules HeLa, et un essai kinase a été réalisé après capture GST. Seul les fragments de XRCC1 contenant le domaine BRCT1 ont été trouvés associés à DNA-PK, et phosphorylés *in vitro*, confirmant que le domaine BRCT1 est non seulement le domaine d'interaction entre XRCC1 et DNA-PK, mais est aussi le domaine cible de cette kinase. Le radiomarquage métabolique *in vivo* nous a permis de montrer que XRCC1 est phosphorylé constitutivement, et qu'il est hyperphosphorylé après exposition des cellules aux rayons X. L'utilisation d'un inhibiteur des PI3 kinases, la wortmanine, d'un inhibiteur spécifique de DNA-PK, ainsi que de cellules déficientes en DNA-PK a prouvé que DNA-PK est la kinase majoritairement impliquée dans

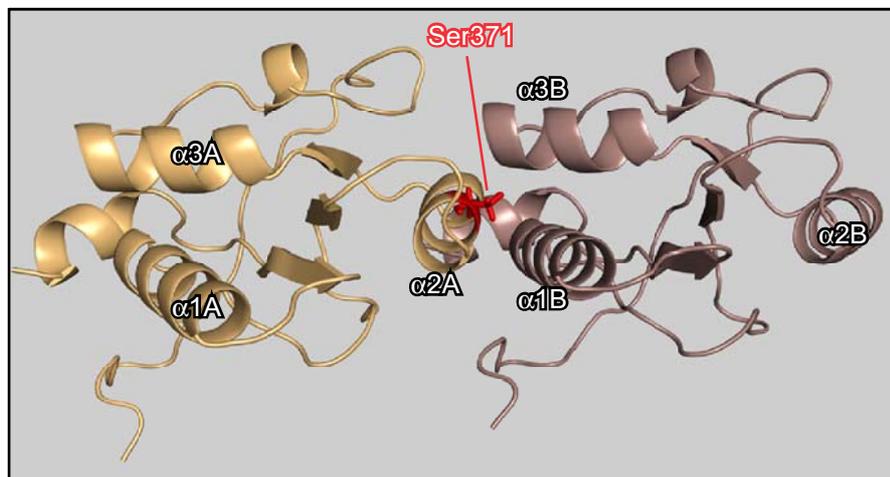
la phosphorylation de XRCC1 en réponse aux dommages dans l'ADN. L'analyse de la séquence du domaine BRCT1 de XRCC1 a montré l'existence d'un unique site de phosphorylation potentiel de type « SQ », au niveau de sa sérine 371. La mutation de cette sérine en leucine abolit la phosphorylation du domaine BRCT1 par DNA-PK, prouvant que cet acide aminé constitue la cible de cette kinase.

Le polymorphisme R399Q de XRCC1, un des plus répandu, a été associé dans certaines études à un défaut de réparation des lésions de l'ADN (Wang et al., 2003b) (Au et al., 2003). Ainsi, puisque cette mutation de l'arginine 399 pourrait avoir un impact sur la structure voisine de la protéine et donc sur la phosphorylation du BRCT1, nous avons examiné la phosphorylation du variant R399Q *in vitro*. Nous avons montré que ce variant est associé avec DNA-PK et qu'il est phosphorylé par cette kinase sur sa sérine 371, au même niveau que la protéine sauvage (résultats non publiés), démontrant que cette mutation ne perturbe pas la phosphorylation de XRCC1 par DNA-PK.

XRCC1 possède plusieurs sites de phosphorylation pour la Caséine Kinase 2. Ces sites sont regroupés dans un même domaine riche en sérines et thréonines, situé entre les deux modules BRCT de la protéine (Loizou et al., 2004). La phosphorylation de ces sites par CK2 régule l'interaction compétitive entre divers facteurs du SSB et XRCC1. Elle favorise ainsi l'interaction entre XRCC1 et PNK (Luo et al., 2004) qui stimule de multiples activités kinases et phosphatases au niveau des cassures de l'ADN et est à ce titre nécessaire au bon déroulement du SSB (Whitehouse et al., 2001). La phosphorylation des sites CK2 contrôle par ailleurs la liaison de l'Aprataxine (Luo et al., 2004) (Gueven et al., 2004), ainsi que la fixation de Xip1 sur XRCC1 (Bekker-Jensen et al., 2007). Dans nos travaux, seule une activité kinase très faible a été trouvée associée avec l'extrémité C-terminale de XRCC1 (aa. 428-633) contenant les sites de phosphorylation CK2 montrant que dans nos conditions d'expérience cette kinase ne co-purifie pas, ou très faiblement, avec XRCC1. De manière intéressante, Kubota et al. ont montré que XRCC1 est une protéine phosphorylée constitutivement en de multiples positions, hyperphosphorylée en réponse à un traitement à l'agent alkylant MMS et que cette hyperphosphorylation est dépendante du domaine BRCT1 de XRCC1 (Kubota and Horiuchi, 2003), et notre travail montre que DNA-PK est vraisemblablement la kinase impliquée dans ces phénomènes.



a) Structure tridimensionnelle des deux domaines BRCT en tandem de BRCA1 et 53BP1.
 La liaison entre les deux domaines met en jeu l'hélice $\alpha 2$ du premier monomère BRCT et les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 3$ du deuxième monomère.



b) Représentation tridimensionnelle spéculative d'un dimère de domaines BRCT1 de XRCC1.
 La sérine 371 est située dans l'hélice $\alpha 2$ du premier monomère, au coeur de l'interface entre les deux domaines BRCT1.

Figure 19 : Structure tridimensionnelle des tandems de modules BRCT de BRCA1 et 53BP1. Modèle d'un dimère de domaines BRCT1 de XRCC1

C) La phosphorylation de la sérine 371 par DNA-PK contrôle la transition entre une forme dimère et une forme monomère de XRCC1

Le domaine BRCT1 est fortement conservé au cours de l'évolution (figure 10) et est requis pour la survie des cellules après traitement par des agents alkylants, mais ces mécanismes ne sont pas encore bien compris. Ce domaine est responsable de l'interaction entre XRCC1 et PARP-1 et PARP-2 qui entraîne une inhibition de l'activité de ces enzymes (Masson et al., 1998) (Schreiber et al., 2002). Il contient aussi un site de liaison au poly(ADP-ribose) synthétisé par les PARP-1 et PARP-2 en réponse aux dommages dans l'ADN (Pleschke et al., 2000), ce qui lui permet d'être recruté en quelques secondes aux sites de coupures simple-brin de l'ADN (Okano et al., 2003) (El-Khamisy et al., 2003). La phosphorylation de la sérine 371 de XRCC1 ne semble pas influencer ce processus, car la forme mutante S371L de XRCC1 est toujours recrutée au niveau des lésions de l'ADN (résultats non publiés). Le domaine BRCT2 de XRCC1 permet son interaction avec LigIII α , et est nécessaire au bon déroulement du SSBR pendant la phase G1 du cycle cellulaire (Taylor et al., 1998) (Moore et al., 2000). Différentes études ont montré que ce domaine peut être trouvé sous forme d'un homodimère *in vitro*, grâce à des interactions entre les hélices $\alpha 1$ des deux monomères (Zhang et al., 1998) (Mani et al., 2004) (Beernink et al., 2005) (figure 12). Néanmoins, nous avons montré par capture GST, immunoprécipitation et far-western blot que XRCC1 dimérise *via* son domaine BRCT1, et non son domaine BRCT2.

Les domaines BRCT sont couramment trouvés par deux sous forme de tandem (et parfois sous forme de multimère de plus grand ordre), notamment chez BRCA1 ou 53BP1 qui sont des modèles d'étude des domaines BRCT (Joo et al., 2002). L'association en tandem entre les deux domaines BRCT est permise par des interactions entre des acides aminés situés dans l'hélice $\alpha 2$ du premier domaine BRCT et des résidus des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 3$ du deuxième (figure 19a). Il a été démontré que ces tandems de BRCT ont la faculté de reconnaître spécifiquement des peptides phosphorylés (Yu et al., 2003a) (Botuyan et al., 2004). On peut ainsi supposer que la dimérisation de XRCC1 par son domaine BRCT1 lui permet de reformer un tandem de domaines BRCT, et ainsi d'interagir préférentiellement avec certains partenaires phosphorylés au cours du cycle cellulaire. La sérine 371 de XRCC1 est située dans l'hélice $\alpha 2$ de son domaine BRCT1 (figure 19b). Cette hélice étant impliquée dans la

formation des tandems de BRCT, nous avons cherché à déterminer si la phosphorylation de la sérine 371 pouvait perturber la dimérisation du domaine BRCT1. La phosphorylation *in vitro* du BRCT1 de XRCC1 exprimé en fusion avec la GST entraîne une forte diminution de sa copurification avec la forme pleine longueur de XRCC1. Inversement, le domaine BRCT1 déphosphorylé par traitement à la λ phosphatase est fortement associé à XRCC1 pleine longueur. Ces résultats ont été confirmés par l'étude du mutant non phosphorylable S371L qui dimérise fortement, alors que le mutant pseudo-phosphorylé S371D ne dimérise plus. La phosphorylation de la sérine 371 par DNA-PK contrôle donc la transition entre un état dimère et un état monomère de XRCC1, vraisemblablement par perturbation de l'interface entre les domaines BRCT1 des deux monomères. Par ailleurs, il a été décrit chez BRCA1 que cette même zone d'interaction entre les modules BRCT est aussi le site de liaison spécifique aux phosphoprotéines. Ainsi chez BRCA1, la tyrosine 1700 et la phénylalanine 1704 situés au début de l'hélice $\alpha 2$ du premier BRCT, juste avant le résidu correspondant à la sérine 371 de XRCC1, sont en interaction directe avec une forme de BACH1 phosphorylée au cours des phases S/G2/M du cycle cellulaire (Botuyan et al., 2004). On peut donc supposer que, chez XRCC1, la phosphorylation de la sérine 371 entraîne non seulement la monomérisation du domaine BRCT1, mais aussi la déstabilisation d'interactions spécifiques avec des phosphoprotéines qui mettraient ce dimère BRCT1 en jeu.

D) XRCC1 stimule l'activité de DNA-PK in-vitro

XRCC1 est connu pour stimuler l'activité de plusieurs partenaires au cours du BER/SSBR tels que Pol β (Kubota et al., 1996), PNK (Whitehouse et al., 2001) ou APE1 (Vidal et al., 2001). Nous avons ici conçu un test d'activité kinase *in vitro*, utilisant un substrat de synthèse formé d'un peptide correspondant aux acides aminés 11 à 25 de p53, contenant la sérine 15 de cette protéine qui est un substrat *in vitro* et *in vivo* pour DNA-PK (Lees-Miller et al., 1992) (Woo et al., 1998). Nous avons montré que XRCC1 stimule l'activité de DNA-PK sur la sérine 15 de p53, et que le domaine BRCT1 de XRCC1 est suffisant pour cette stimulation. De plus, seuls XRCC1 sauvage et le mutant S371L, c'est-à-dire les formes dimères de la protéine, sont capables de stimuler l'activité de cette kinase. DNA-PK est une protéine qui s'autophosphoryle en de nombreux sites en réponse aux cassures double-brin de l'ADN (Cui et al., 2005) (Meek et al., 2007) (figure 8). XRCC1 dimère pourrait donc être impliqué dans

une interaction spécifique avec une forme phosphorylée de DNA-PK qui entraînerait l'activation de cette dernière. La phosphorylation de la sérine 15 de p53 est connue pour jouer un rôle dans différents processus cellulaires en réponse aux dommages de l'ADN, tels que l'inhibition des activités de recombinaison homologue (Linke et al., 2003) (Yun et al., 2004) (Restle et al., 2005), le contrôle de la progression de la cellule dans le cycle cellulaire (Fiscella et al., 1993), ou encore le déclenchement du processus de mort cellulaire par apoptose (Dhanalakshmi et al., 2005) (Park et al., 2005). L'interaction entre XRCC1 et DNA-PK aboutit donc à une stimulation de son activité, ce qui permet d'une part la monomérisation de XRCC1, et permettrait d'autre part une régulation des voies cellulaires de signalisation et de réparation des dommages dans l'ADN.

E) La phosphorylation de la sérine 371 de XRCC1 est requise pour la réparation efficace des cassures double-brin de l'ADN

Afin de comprendre l'importance *in vivo* de l'interaction entre XRCC1 et DNA-PK et de la phosphorylation de la sérine 371, nous avons exprimé la forme sauvage ou mutante S371L de XRCC1 dans des cellules EM9 déficientes pour cette protéine. Après irradiation aux rayons X nous avons étudié la cinétique de réparation des cassures double-brin de l'ADN dans les différentes lignées par observation des foyers γ H2AX, marqueurs de cassures double-brin. Les cellules EM9 présentent spontanément un niveau élevé de cassures double-brin dans l'ADN et le nombre de foyers γ H2AX observé est fortement augmenté après irradiation des cellules. Seule la forme sauvage de XRCC1 a été capable de restaurer le défaut de réparation constaté dans les cellules EM9, démontrant l'importance de la phosphorylation de la sérine 371 de XRCC1 par DNA-PK dans cette résolution des cassures de l'ADN. La forme mutante S371L de XRCC1 étant toujours recrutée aux sites de cassure simple-brin de l'ADN, et donc vraisemblablement fonctionnelle dans les voies de BER/SSBR, on peut ici exclure la possibilité que le nombre élevé de cassures double-brin observé provient de cassures simple-brin de l'ADN non réparées converties en cassures double-brin par collision avec la fourche de réplication au cours de la phase S du cycle cellulaire. Cette incapacité du mutant XRCC1 S371L à restaurer une résolution efficace des cassures double-brin de l'ADN est surprenant au premier abord car la forme S371L de XRCC1 est capable de stimuler l'activité de DNA-PK *in vitro*. Deux étapes successives doivent donc avoir lieu dans ce mécanisme. Dans un premier

temps XRCC1 dimère interagit avec DNA-PK et stimule son activité. La phosphorylation de XRCC1 et sa monomérisation conséquente doit alors être nécessaire au recrutement des autres facteurs de la réparation des cassures double-brin par DNA-PK.

F) XRCC1 constitue un relais moléculaire entre les voies de SSBR et DSBR

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer un modèle dans lequel XRCC1 sous forme dimère (figure 20a) serait impliqué dans les voies de BER/SSBR au cours de la phase G1 du cycle cellulaire (figure 20b). Au cours de la phase S, en cas de collision entre la fourche de réplication et une cassure simple-brin non réparée et de la conversion de celle-ci en une cassure double-brin (figure 20c), XRCC1 interagirait avec DNA-PK, stimulant l'activité de cette dernière. En retour, DNA-PK phosphorylerait XRCC1 sur sa sérine 371, provoquant sa monomérisation et permettant alors le recrutement des effecteurs de la réparation des cassures double-brin (figure 20d). En outre, la phosphorylation de la sérine 15 de p53 par DNA-PK pourrait favoriser la réparation de la cassure double-brin par un mécanisme dépendant de DNA-PK en inhibant la voie de recombinaison homologue. XRCC1 organiserait ainsi un relais moléculaire entre les voies de SSBR et DSBR, permettant une réponse cellulaire rapide en cas de conversion d'une cassure simple-brin de l'ADN en cassure double-brin.

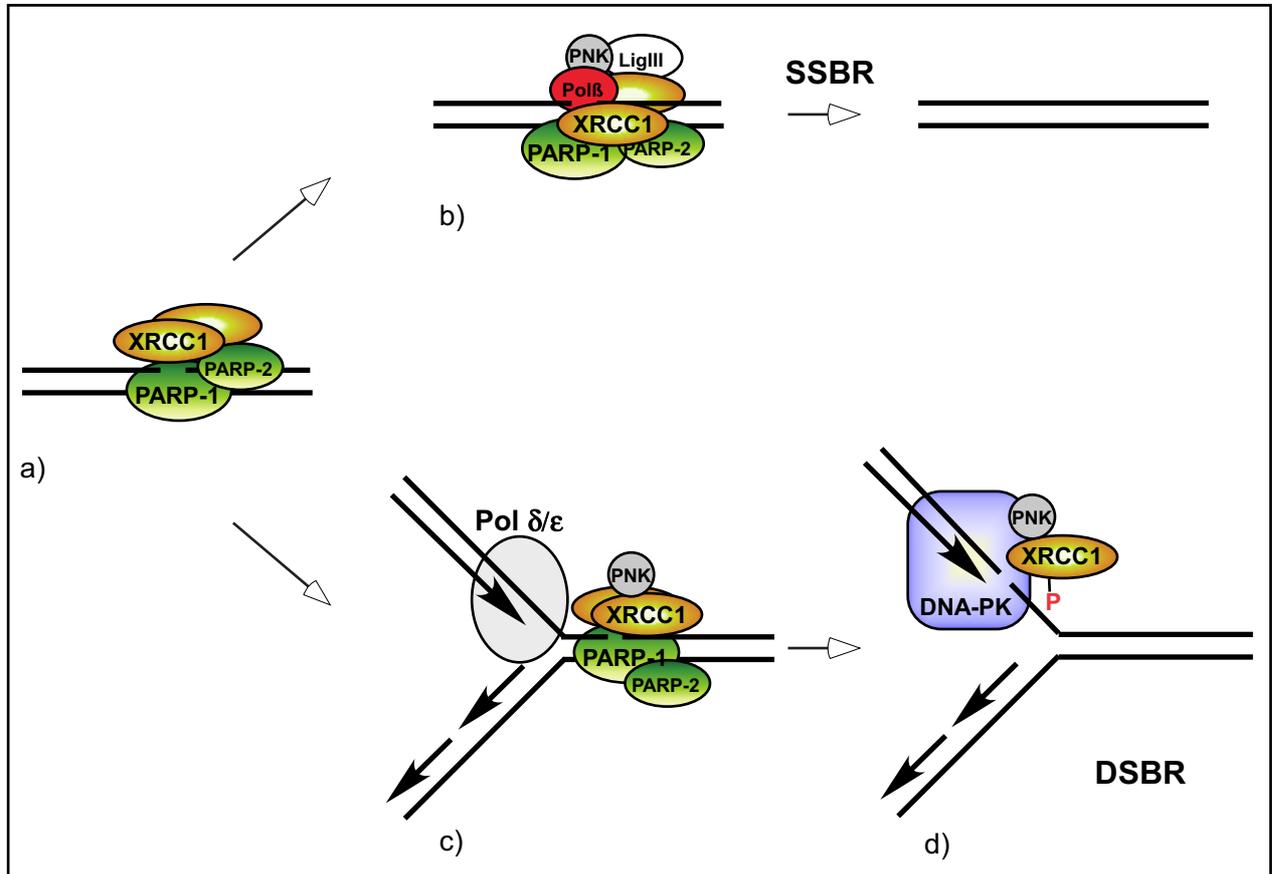


Figure 20 : Modèle de la transition SSBR/DSBR organisée par XRCC1 et DNA-PK. En présence d'une cassure simple-brin dans l'ADN, XRCC1 est recruté au site de la lésion sous forme dimère (a) par le poly(ADP-ribose) synthétisé par PARP-1 et participe à la réparation de la cassure simple-brin (SSBR) (b). En cas de collision entre la machinerie répliquative et le complexe de SSBR (c) et de transformation de la cassure simple-brin en cassure double-brin (d), XRCC1 stimule l'activité de DNA-PK dans les voies de signalisation cellulaire des dommages de l'ADN et de réparation des cassures double-brin (DSBR) et en retour DNA-PK phosphoryle XRCC1 sur sa sérine 371, entraînant sa monomérisation.

2^e PARTIE

XRCC1 interagit avec p58 pour réguler l'avancement de la fourche de réplication sur un ADN endommagé

Introduction

Publication N°2

Discussion des résultats

I. Introduction

Différentes études ont suggéré que l'hypersensibilité aux agents alkylants et aux rayonnements ionisants des cellules déficientes pour XRCC1 pourrait être liée à un défaut de prise en charge des cassures simple-brin non réparées au cours de la réplication de l'ADN. L'implication de XRCC1 dans la coordination entre réplication et réparation de l'ADN est argumentée par le temps de génération plus long des cellules EM9 déficientes en XRCC1 que celui des cellules sauvages (Thompson et al., 1982). Un très grand nombre d'échanges de chromatides sœurs (SCE) est observé dans les cellules EM9 déficientes pour XRCC1 cultivées en présence d'analogues halogénés de nucléotides (Thompson et al., 1982) (Carrano et al., 1986). Ces SCE surviennent lors de la réplication de l'ADN, quand la fourche de réplication entre en collision avec des cassures simple-brin non réparées et se désassemble, puis que la cassure double-brin ainsi générée est résolue par recombinaison homologue avec la chromatide sœur. Par ailleurs, les cellules traitées par ARN interférence dirigé contre XRCC1 présentent un délai dans leur progression à travers le cycle cellulaire suite à une exposition à l'agent alkylant MMS (Brem and Hall, 2005). De plus, on peut observer un défaut du redémarrage de la synthèse d'ADN après traitement au MMS dans les cellules EM9 exprimant une forme de XRCC1 portant une mutation au sein du domaine BRCT1 (Kubota and Horiuchi, 2003). Ce même domaine est par ailleurs nécessaire à la survie des cellules en prolifération après traitement au MMS (Taylor et al., 2002). Enfin, il a été démontré que XRCC1 interagit directement avec la protéine répllicative PCNA *in vitro* et *in vivo* au cours de la réplication de l'ADN (Fan et al., 2004), et que le traitement de cellules par ARN interférence dirigé contre XRCC1 entraîne une diminution de l'accumulation de PCNA au niveau des cassures de l'ADN générées par irradiation laser (Lan et al., 2004).

De manière intéressante, certains travaux ont démontré l'implication possible de PARP-1, partenaire essentiel de XRCC1 au cours du BER/SSBR, dans la coordination entre réparation et réplication de l'ADN. PARP-1 interagit ainsi avec le complexe ADN polymérase α -primase (Pol α -primase) (Simbulan et al., 1993) (Dantzer et al., 1998) ainsi qu'avec l'hélicase Werner (WRN), protéine impliquée dans la réplication des ADN endommagés (Adelfalk et al., 2003) (Lebel et al., 2003). De plus, il a été montré que PARP-1 est essentielle au redémarrage des fourches de réplication après endommagement de l'ADN (Yang et al., 2004).

L'ensemble de ces éléments suggère fortement une implication du complexe XRCC1/PARP-1 dans la régulation de l'avancement des fourches de réplication sur un ADN endommagé.

La formation d'une fourche de réplication fonctionnelle requiert l'assemblage successif et ordonné de grands complexes multiprotéiques au niveau des origines de réplication de l'ADN (voir les revues suivantes : (Bell and Dutta, 2002) (Maiorano et al., 2006) (Sclafani and Holzen, 2007)). Les origines de réplication sont initialement reconnues et liées par les protéines du complexe de l'origine de réplication (ORC1-6) qui vont catalyser avec Cdc6 et Cdt1 la formation des complexes pré-répliatifs (pré-RC) en chargeant le complexe hélicase MCM2-7 au niveau de l'origine de réplication. L'activation des pré-RC au cours de la phase S du cycle cellulaire permet le recrutement de facteurs de réplication supplémentaires permettant la formation des complexes de pré-initiation (pré-IC) ayant la capacité d'ouvrir la double hélice d'ADN et de recruter les ADN polymérasés et autres facteurs requis pour la synthèse active d'ADN. Les ADN polymérasés étant incapables d'initier la synthèse d'ADN sur un brin matrice nu, ce processus nécessite dans un premier temps la synthèse d'une amorce d'ARN par l'ADN primase, composée des deux sous-unités très fortement associées, p48 et p58 (voir les revues (Arezi and Kuchta, 2000) et (Garg and Burgers, 2005a)). La protéine p48 possède l'activité catalytique de l'ADN primase, c'est elle qui incorpore les ribonucléotides lors de la synthèse de l'amorce. La sous-unité p58 a, quant à elle, un rôle de régulateur et de stabilisateur de l'activité de p48. Cette ADN primase forme, avec les sous-unités p70 et p180, le complexe Pol α -primase. L'amorce d'ARN est ensuite allongée par la sous-unité p180, Pol α , ce qui caractérise la formation des complexes d'initiation de la réplication (IC). Puis, le facteur de réplication RFC se fixe à l'hétéroduplexe ADN/ARN et stimule le chargement de l'anneau de processivité PCNA sur l'ADN. Enfin, PCNA s'associe aux ADN polymérasés répliatifs Pol δ et Pol ϵ , augmentant leur processivité et remplaçant Pol α pour poursuivre la synthèse d'ADN.

Dans cet article nous décrivons l'interaction directe et spécifique entre XRCC1 et la sous-unité p58 du complexe Pol α -primase, *in vitro* et *in vivo*. Cette interaction implique le domaine BRCT1 de XRCC1 et la moitié N-terminale de p58. Nous montrons que p58 lie le PAR ce qui entraîne l'inhibition de son activité. La surexpression du domaine BRCT1 de XRCC1 dans des cellules HeLa induit une forte activité PARP se traduisant notamment par

l'hétéromodification du domaine BRCT1 surexprimé, en réponse aux dommages de l'ADN. Les cellules surexprimant le domaine BRCT1 s'accumulent en début de phase S après traitement par un agent alkylant, et similairement, l'addition de BRCT1 recombinant purifié dans des extraits d'œufs de xénope inhibe fortement la réplication d'un ADN endommagé. Nous montrons que cette inhibition de la réplication a lieu entre la formation des complexes de pré-initiation et le recrutement de PCNA, et qu'elle est dépendante de la synthèse de PAR. Ces résultats suggèrent que lors de la réplication d'un ADN endommagé, le couple XRCC1/PARP-1, via le PAR porté par le domaine BRCT1 de XRCC1, freine l'avancement de la fourche de réplication en interagissant avec p58, inhibant de la sorte l'ADN primase. Ceci permettrait à la cellule de réparer les lésions présentes sur l'ADN afin d'éviter la collision entre la fourche de réplication et une cassure simple-brin de l'ADN non réparée, et sa conversion en cassure double-brin hautement génotoxique. Ces résultats fournissent donc les premières preuves directes de l'implication de XRCC1 et PARP-1 dans la coordination entre réparation et réplication de l'ADN.

II. Publication n° 2 :

Nicolas Lévy, Domenico Maiorano, Maren Oehlman, François Delalande, Heinz-Peter Nasheuer, Alain Van Dorsselaer, Valérie Schreiber, Gilbert de Murcia, Josiane Ménissier-de Murcia and Anne Bresson

XRCC1 interacts with DNA primase to regulate replication fork progression in the presence of DNA damage.

Soumission à EMBO Journal décembre 2007.

XRCC1 interacts with DNA primase to regulate replication fork progression in the presence of DNA damage

Nicolas Lévy¹, Maren Oehlmann², François Delalande³, Heinz-Peter Nasheuer², Alain Van Dorsselaer³, Valérie Schreiber¹, Gilbert de Murcia¹, Josiane Ménissier-de Murcia^{1,=}, Domenico Maiorano^{4*} and Anne Bresson^{1*}

¹ : Département Intégrité du Génome UMR 7175, CNRS/ULP, ESBS, Bld S. Brant, BP 10413 - 67412 Illkirch-Cedex, France

² : National University of Ireland, Galway, Department of Biochemistry, Cell Cycle Control Laboratory -Galway - Ireland

³ : Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, UMR 7512, CNRS/ ULP, ECPM - 67087 Strasbourg-France

⁴ : Genome Surveillance and Stability Laboratory, Institut de Génétique Humaine, 141, rue de la Cardonille -34396 Cedex 5 Montpellier. France.

**: Corresponding authors: Dr. Anne Bresson, Département Intégrité du Génome UMR 7175, CNRS/ULP, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Boulevard S. Brant, F-67412 Illkirch. France. Tel. +33 390 244 700, Fax. +33 390 244 686, e-mail: anne.bresson@esbs.u-strasbg.fr*

Dr. Domenico Maiorano, Genome Surveillance and Stability Laboratory, Institut de Génétique Humaine, 141, rue de la Cardonille -34396 Cedex 5 Montpellier. France. Tel. +33 499 619 912; Fax: +33 499 619 901; E-mail: maiorano@igh.cnrs.fr

=: This paper is dedicated to the memory of our colleague Josiane Ménissier-de Murcia who passed away on July 15th 2007.

ABSTRACT

XRCC1 functions as a scaffold protein in both base excision repair (BER) and single-stranded break repair (SSBR) through functional interactions with many key enzymes of these pathways. The BRCT1 domain of XRCC1 (XRCC1-BRCT1) triggers the recruitment of XRCC1 to single strand breaks by promoting interaction with poly(ADP-ribose)ated PARP-1, and is critical for efficient BER/SSBR during S and G2 phases of the cell cycle. In a search for new XRCC1-BRCT1 interacting partners, by proteomics, we identified the p58 subunit of the Pol α -primase. The interaction between XRCC1 and p58 was confirmed *in vivo* and found to be enhanced by replication fork arrest. *In vitro* experiments reveal that the N-terminal part of p58 specifically binds to both XRCC1 and poly(ADP-ribose) (PAR). Moreover PAR strongly inhibits primase activity by competing with DNA binding on p58. The XRCC1-BRCT1, but not BRCT2 domain, is recruited to DNA damage sites *in vivo*, colocalizing with PAR. Overexpression of XRCC1-BRCT1 in HeLa cells induces massive PAR synthesis together with PARP1 and XRCC1-BRCT1 poly(ADP-ribosylation), in the presence of DNA damage, and leads to accumulation of cells in S-phase, suggesting inhibition of DNA synthesis. Consistent with this conclusion, addition of recombinant XRCC1-BRCT1 to *Xenopus* cell-free egg extracts slows down DNA synthesis and inhibits PCNA, but not MCM2, binding to MMS-treated chromatin, indicating interference with the assembly of functional replication forks. Altogether these results suggest that repair proteins of the first steps of the SSBR pathway, such as PARP1 and XRCC1, and Pol α -primase, functionally interact to halt DNA replication through DNA damage and allow repair to occur.

INTRODUCTION

The cellular response to DNA damage produced by environmental agents or generated by the cellular metabolism, involves the coordinated activation of various enzymatic activities aimed at detecting, signaling and resolving faithfully genomic discontinuities. In mammals, thousands of single-strand breaks (SSBs) arising daily from intermediates of base excision repair (BER) have to be repaired to prevent chromosome aberrations and mutations. In higher eukaryotes the efficiency of single-strand break repair (SSBR) pathway seems to rely on unique enzymes and factors such as XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group 1) and DNA ligase III. These activities that are essential for early embryonic development in mice are absent in yeast.

XRCC1 plays a crucial role in the coordination of two overlapping repair pathways, BER and SSB. In the early steps of BER, that involve specific DNA glycosylases in the removal of damaged bases, XRCC1 was reported to have a stimulatory effect. In the post-incision steps, common to SSB and BER pathways, XRCC1 is associated with several enzymes responsible for: DNA-break detection and signaling (polyADP-ribose polymerase-1 and -2, PARP-1 and PARP-2, respectively); processing of 3' phosphate termini (polynucleotide kinase, PNK); gap filling (DNA polymerase β or DNA polymerase δ , ϵ) ligation of DNA ends (DNA ligase III or DNA ligase I) (Reviews [1] [2]). In this choreography, the two BRCT domains (BRCT1 and BRCT2) of XRCC1 mediate a network of protein-protein interactions with several factors of the SSB and base damage repair pathways. The BRCT1 domain is the most evolutionarily conserved and is required for survival after methylation damage but its precise function is not fully understood at present. It interacts with PARP-1 and PARP-2 and limits their poly(ADP-ribose)ating activities. The BRCT1 contains a binding site for poly(ADP-ribose) (PAR). As a consequence, in response to the activation of PARP-1 by SSBs, XRCC1 is recruited within seconds to the sites of chromosomal DNA strand breakage by its BRCT1 domain. The BRCT2 domain of XRCC1 binds to and stabilizes DNA ligase (Lig III) [3].

On the other hand, several observations suggest that the hypersensitivity of XRCC1-mutant cell lines to monofunctional alkylating agents, such as ethyl or methyl methanesulfonate (EMS or MMS), and to ionizing radiation results from unrepaired SSBs encountered by the DNA replication fork during S-phase. A role for XRCC1 in coordinating DNA repair and DNA replication is supported by the fact that XRCC1 deficient cell lines exhibit an increased doubling time and display a markedly elevated level of sister-chromatid exchange (SCE). SCE arise from a mechanism involving unrepaired SSB, DSB formation upon replication fork block and collapse at the SSB site followed by homologous recombination (HR) using the sister chromatid. Interestingly, one of the hallmarks of XRCC1, LigIII or PARP-1 deficiency is elevated SCE. Moreover, Kubota and Horiuchi [4] found that a mutant in the BRCT1 domain of XRCC1 is defective in the restart of DNA replication following MMS treatment, while this mutant is proficient in repair. Recently, Lan et al [5] showed that a siRNA against XRCC1 decreased PCNA accumulation on SSBs induced by laser irradiation and Fan et al [6] reported on a direct interaction between XRCC1 and PCNA *in vitro* and *in vivo* in S-phase. Altogether, these results further extended a possible link between the SSB machinery and the replicative apparatus.

The formation of functional DNA replication forks occurs by the sequential assembly of large multiprotein complexes at DNA replication origins (reviewed in [7] [8] [9]) that are bound by the origin replication complex (ORC1-6) which, together with the Cdc6 and Cdt1 proteins, catalyzes the formation of prereplicative complexes (pre-RCs), namely the assembly of the

MCM2-7 helicase complex. Activation of preRCs during S phase allows the recruitment of additional replication factors to form pre-initiation complexes (preICs) that can support DNA unwinding and recruit the DNA polymerases and other factors required to promote active DNA synthesis. To begin DNA synthesis, an initial RNA primer is synthesized by the DNA primase, which is made of two subunits, p48 and p58. This short RNA primer is then extended by DNA polymerase α (Pol α) and marks the formation of initiation complexes (Ics). Then replication factor C (RFC) binds to the primer template junction and catalyzes the loading of the ring-shaped replication factor PCNA that encircles DNA. Then PCNA associates with the replicative polymerases Pol δ or Pol ϵ , enhancing Pol δ processivity and taking over DNA synthesis from Pol α (elongation step).

Here we show that the BRCT1 domain of XRCC1 specifically interacts *in vitro* and *in vivo* with the p58 subunit of DNA polymerase α -primase in HeLa cells. We show that p58 interacts with PAR resulting in inhibition of primase activity *in vitro*. Consistent with these findings, the expression of the BRCT1 domain of XRCC1 in HeLa cells or in *Xenopus* extracts interferes with ongoing DNA synthesis only in the presence of DNA damage, in a PAR-dependent manner. These results suggest that the BRCT1 domain of XRCC1 plays a unique function in regulating DNA replication across SSBs during S phase.

MATERIALS AND METHODS

Construction of XRCC1 and p58 Expression Vectors

From the human DNA primase p48-His-tagged-p58 and p58 C-terminus cloned in pET11 [10] we amplified by PCR the DNA sequence encoding p58 (amino acids 1 to 266) and cloned it in the NdeI and BamHI restriction sites of the pET 15b vector (Novagen).

Fragments from XRCC1 gene were PCR-amplified and fused to GST in the pBC vector: human XRCC1 as in [11] and *Xenopus* XRCC1, aa 307 to 414 encompassing the BRCT1 domain and aa 556 to 651 containing the BRCT2 domain.

The human BRCT1 (from aa 282 to 428) and BRCT2 (427 to 633 aa) domains were also cloned into a pEGFP vector (GFP fragment cloned in N-terminus of the BRCTs) giving GFP-BRCT1 and GFP-BRCT2 vectors, respectively.

Antibodies

The following antibodies were used: Rat monoclonal anti-p58 [12] and anti-RPAp32 antibodies [13], mouse monoclonal anti-GST antibody (kindly given by M. Oulad, Monoclonal Antibodies Service, IGBMC, Illkirch), rabbit polyclonal anti-RPA antibody (D. Maiorano, IGH, Montpellier), rabbit polyclonal anti-ORC1 antibody [14], rabbit polyclonal anti-MCM2 antibody (AbCam), goat polyclonal anti-XRCC1 antibody (D-18 sc-5902, Santa Cruz Biotechnology Inc), rabbit polyclonal anti-XRCC1 and anti- γ H2AX antibodies (Alexis), rabbit polyclonal anti-PAR and mouse monoclonal anti-BrdU antibodies (Becton Dickinson and Company). Secondary antibodies, from Molecular Probes, are either Goat anti-mouse or goat anti-rabbit antibodies, peroxidase-conjugated or alexa 488/alexa 568-conjugated. Donkey anti rat is peroxidase-conjugated or alexa 488/alexa 568-conjugated.

Protein expression and purification

To simplify purification proteins were either fused to GST- of polyhistidine-tags. These fusion proteins were expressed in *E. coli* and purified using either the affinity of GST for glutathione-coupled beads (GE Healthcare, Amersham Biosciences) or the interaction between the recombinant protein and Ni^{2+} ions immobilized on a silica-based resin (Protino^R Ni, Machery-Nagel) for affinity purification, respectively, as recommended by manufacturers. Crude extracts from HeLa cells were obtained by scraping confluent cells directly on plates with Laemmli buffer.

Pull-Down assays and Immunoprecipitation

As indicated cells are treated with HU 4mM for 4h. Cells were washed two times with ice cold PBS. All steps were performed at 4°C. For GST pull-down assay, cells were lysed in 150 μL of a buffer containing 20 mM Hepes pH 7.4, 400 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 5 mM DTT, 20% glycerol, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) with protease inhibitors (Complete Mini, Roche Molecular Biomedicals, Mannheim, Germany) and centrifuged 20 min at 13,500 g to remove cellular debris. GST-pull-down assays were performed as described [15]. For immunoprecipitation assays, nuclear extracts were pre-cleared with protein-A Sepharose (GE Healthcare, Amersham Biosciences) for 30 min before addition of antibodies and incubated on a rotating platform for 2 h. Protein-A Sepharose beads were then added for 1 h incubation to capture immunocomplexes. Beads were washed three times in 150 mM KCl, 20 mM Hepes pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF and 0.2% Nonidet P-40 prior resuspension in Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred onto

nitrocellulose membrane, subjected to western blotting analysis and visualized by ECL⁺ (GE Healthcare, Amersham Biosciences).

Mass spectrometry

GST or GST-XRCC1 (282-428) expressed in *E. coli*, fixed on glutathione-coupled beads were used to purify interacting proteins from HeLa cell extracts. Proteins were separated on SDS-PAGE gel, stained with SYPRO-ruby and gel slices containing protein bands of interest were excised and processed for mass spectrometry. In-gel digestion was performed with an automated protein digestion system, MassPREP Station (Waters, Milford, MA). The resulting peptide extracts were directly injected for nanoscale capillary LC-MS/MS (nano-LC-MS/MS) analysis [16]. Mass data acquisitions were piloted by MassLynx software (Waters) using automatic switching between MS and MS/MS modes as described previously [17].

Immunofluorescence.

Cells (10^5) grown on glass cover slips, in DMEM medium containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 0.5% gentamicin, were treated or not with Hydroxyurea (HU, 4mM for 4h at 37°C) or H₂O₂ (1 mM for 10 min at room temperature) and processed for immunofluorescence after the indicated time of recovery. Cells were washed twice in cold PBS, fixed for 15 min on ice in methanol/acetone (1:1) and subsequently incubated for 5 min at 4°C with 0.5% Triton X100, 20 mM Hepes pH 7.4, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose and washed twice with PBS, 0.1% Triton X100. Cells were then incubated 40 min at 37 °C with first antibodies in PBS, 2% BSA. After two washes with PBS, 0.1% Triton X100, cells were incubated for 30 min at 37 °C with respective second antibodies (Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 568) in PBS, 2% BSA. Cells were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) and mounted in MOWIOL. Immunofluorescence was evaluated using a DMRA2 (Leica) microscope, equipped with an ORCA-ER chilled CCD camera (Hamamatsu) and the capture software Openlab (Improvision).

Damages induced by laser-light irradiation

Cells were grown on cover slips and treated with Hoechst dye 33258 10 min 37°C prior to irradiation with a microdissection laser (Leica AS LMD) at 337 nm to induce local DNA damages as in Paull et al [18]. Cells were immediately fixed with methanol/acetone (1:1) and processed further for immunodetection as described above.

PAR-binding, DNA-binding, Far-western blotting

Proteins were separated (2 µg) by SDS-PAGE or dot-blotted directly on membrane (1 or 2 µg, as indicated). Polyacrylamide gels were incubated 1h at RT in a 50 mM Tris pH8, 30% glycerol buffer, and proteins were transferred on nitrocellulose membranes for PAR and DNA binding or on PVDF membranes for far-western blotting. Proteins were then renatured overnight at 4°C in a 50 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,3% Tween20, 5% non-fat dried milk buffer. *In vitro* PAR synthesis was performed as in [19]. For PAR binding either anti-PAR immunostaining was performed or, as for DNA binding, membranes were incubated 1h at 4°C with ³²P radiolabeled PAR or DNA, washed 3 times in PBS and submitted to autoradiography. For far-western blotting, membranes were incubated for 1h at RT in 50 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, 0,3% Tween20, 3% non fat dried milk buffer containing 5 µg/ml of recombinant XRCC1. Membranes were rinsed 3 times in 50 mM Tris pH8, 400 mM NaCl, 0,3% Tween20 buffer and bound XRCC1 was revealed by western-blot with a rabbit polyclonal anti-XRCC1 antibody (1/1000 in dilution).

Band shift assay

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were carried out to analyze primase binding with PhiX174-ssDNA as previously described [20]. In short, 2µg of primase (p48/p58) was incubated with 70 ng PhiX174-ssDNA and increasing amounts (0, 63, 127 and 255 ng) of PAR in binding buffer (final concentration: 10 mM Tris/HCl pH 7.5 and 5 mM EDTA, 50 mM NaCl and 1 µg BSA) at 25°C for 30 min. The protein-DNA complexes were separated by 0.8% agarose gel electrophoresis with 60 mA for 4h. The DNA was then stained with ethidium bromide and ssDNA and protein-DNA complexes were determined using a fluorimager FLA-5100 and the software ImageGauge version 4.2.3 (Fuji Europe, Düsseldorf, Germany).

Primase activity

One unit of DNA primase (p48-p58) is incubated with 0,1 mM (nucleotide concentration) oligo (dT)₂₀, 500 µM ATP and 10 µCi [α ³²P]ATP in a 10 mM Tris Ac pH 7.3, 10 mM MgAc, 1 mM DTT and 0.1 mg/mL BSA buffer. After 15 min at 37°C, the reactions were spotted on DE81 filters (Whatman). Filters were washed 4 times in 0,4 M ammonium bicarbonate, 1% PPI rinsed twice in H₂O, dried, and submitted to scintillation counting in Ultima Gold scintillation liquid (Packard).

Cell cycle experiments

HeLa cells ($5 \cdot 10^5$) were grown in 10 cm Petri dishes in DMEM medium containing 10% FBS 0.5% gentamicin. Cells were transiently transfected with the pBC or pBC-XRCC1-BRCT1 (282-428) vector using JetPEI transfection reagent (Polyplus Transfection). When indicated, cells were incubated 30 min at 37°C in DMEM medium containing 1 mM MNU (Sigma), washed and grown in fresh culture medium for 20 h. Cells were pulse labelled 30 min at 37°C in DMEM medium supplemented with 5 μ M BrdU (Sigma). After two PBS washes, cells were detached by trypsination, washed in PGE (PBS 1x, 1g/L glucose, 1 mM EDTA) buffer and fixed for 30 min on ice in EtOH 70% in PGE. Cells were centrifuged and incubated 4 h at 4°C in 5 mL PGE for rehydration. Cells were treated 15 min at RT in 2N HCl in PGE, collected by centrifugation, and resuspended in 2 mL neutralization PTTB buffer (PBS 1x, 0,5% Tween20, 0,5% BSA, 0,1M sodium tetraborate) and washed twice in PTB buffer (PBS 1x, 0,5% Tween20, 0,5% BSA). They were then incubated 1 h at room temperature in mouse monoclonal anti-BrdU antibodies (Becton Dickinson) diluted 1:3 and rabbit polyclonal anti-GST antibodies (Sigma) diluted 1:2000. After two washes in PTB buffer, cells were incubated 1 h at room temperature in Alexa 488 conjugated Goat anti-mouse secondary antibodies (Invitrogen) at 1:500 and PE conjugated donkey anti-rabbit secondary antibodies (Jackson Immuno Research) at 1:200. After two washes in PTB buffer cells were counterstained with 10 μ g/mL 7-Aminoactinomycin-D (7-AAD, Sigma) in PGE. Flow cytometry analysis was performed using a FACS Calibur and the Cell Quest software (Becton Dickinson).

***Xenopus* extracts and DNA replication assay**

Egg extracts were prepared as described previously [21]. Upon thawing, extracts were supplemented with cycloheximide (250 μ g/ml) and an energy regeneration system (10 μ g/ml creatine kinase, 10mM creatine phosphate, 1mM ATP, 1mM $MgCl_2$). When recombinant proteins were added, these were incubated in egg extracts 10 min on ice before addition of sperm chromatin. To follow DNA replication by incorporation of radiolabelled nucleotide into newly replicated DNA, 1 μ l of α -[^{32}P]dATP or dCTP (3000 Ci/mmol) was added to a standard reaction of 50 μ l and the amount of newly synthesized DNA was determined TCA precipitation on GF/C glass fibers filters followed by scintillation counting. KU0058948 was used as PARP inhibitor [22]. Alkaline gel electrophoresis of DNAs was performed as previously described [23]. Chromatin isolation was as previously described [24].

RESULTS

XRCC1 interacts with the p58 subunit of DNA polymerase α -primase

To identify new proteins interacting with the BRCT1 domain of XRCC1 (aa 282 to 428) we tagged this domain with GST and trapped interacting proteins in GST-pull down experiments. Co-purifying proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by mass spectrometry. The identification of proteins already known to interact with XRCC1 such as PARP1, PCNA and DNA-PKcs were detected and validated our analysis [15] [6] [11]. In addition, we identified the p58_γ subunit of the DNA polymerase α -primase complex as XRCC1-BRCT1-interacting protein (Figure 1A).

To test whether p58 and XRCC1 coexist in a common protein complex *in vivo*, immunoprecipitation experiments were performed using extracts from HeLa cells treated or not with Hydroxyurea (HU) to block DNA replication. As shown in Figure 1B, p58 was co-immunoprecipitated with XRCC1, specifically after HU treatment. To determine if additional factors involved in the initiation of DNA replication are associated with XRCC1 we tested the co-immunoprecipitation of the replication fork-associated protein complex RPA. The total level of the RPA 32 kDa subunit increased after treatment with HU as expected. However, we observed mainly the non-phosphorylated or low phosphorylated form of the RPA 32, which is the specific isoform associated with replication forks [25] [26] co-immunoprecipitating with XRCC1 (Figure 1B). Altogether, these results suggest a preferential interaction between XRCC1, DNA primase and RPA32 during stalling of DNA replication forks.

In order to map the p58 and interaction domain(s) within XRCC1, GST fusion proteins were generated that encompass truncated versions of human XRCC1 (Figure 1C, coloured bar): amino acids 1-170 (Pol β binding domain), 170-470, 282-428, 314-428 containing the BRCT1 domain, and 427-633 containing the BRCT2 domain that binds DNA Ligase III. These fusion proteins were overexpressed in HeLa cells and GST pull-down experiments were performed, followed by western blot analysis. The endogenous p58 subunit efficiently copurified with the polypeptides carrying either the N-terminal part of XRCC1 (aa 1-170) and the BRCT1 domain-containing polypeptide but not with the BRCT2-containing C-terminus. In contrast, endogenous RPA32 protein only bound to the BRCT1 domain-containing fragment of XRCC1 (Figure 1C). These results show that the BRCT1 domain of XRCC1 is sufficient for the interaction between the DNA primase and XRCC1.

To further characterize the interaction between XRCC1 and p58, we analyzed the localization of both endogenous proteins by immunofluorescence in asynchronous cells either treated or not with HU. We observed no or very few XRCC1 and p58 foci in untreated cells (Figure 1D). After

HU treatment, p58 and XRCC1 foci number increased and significant colocalization was observed between the two proteins.

Taken together, these results suggest that XRCC1 and DNA primase, via its p58 subunit, can be found associated *in vivo* in response to stalled replication forks.

***In vitro* association of XRCC1 with p58-Nter**

The interaction between p58 and XRCC1 was confirmed *in vitro* by far-western blot analysis. Recombinant wild-type XRCC1 as well as the p48-His-tagged p58 complex were independently expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography (see Materials and Methods). The p48-p58 subunits of primase were separated by SDS-PAGE along with negative (tropomyosine, BSA) and positive (PARP-1) controls, transferred to PVDF membranes and renatured prior incubation with purified XRCC1 protein and immunodetection with anti-XRCC1 antibody. Only the p58 subunit and PARP-1 interacted with XRCC1, under these conditions (Figure 2A). Neither tropomyosine, nor BSA or p48 showed any affinity for XRCC1 (Figure 2B). To further characterize the p58 interaction domain, both the N- (aa 1 to 266) and C-terminal (aa 267 to 509) part of p58 were purified separately as recombinant proteins. As shown in Figure 2B upper panel, only the N-terminus of p58 interacts with XRCC1 demonstrating that this domain is sufficient for the direct interaction with XRCC1.

PAR binds p58 and strongly inhibits DNA primase activity of the p48-p58 complex

It is well established that XRCC1 is recruited within seconds to DNA damage sites through efficient binding to poly(ADP-ribose; PAR) synthesized locally by PARP-1. The observation that XRCC1 interacts with the p58 subunit of the Pol α -primase via its BRCT1 domain and that this domain also interacts with PAR produced at DNA damage sites prompted us to investigate whether the activity of DNA primase could be directly affected by PAR production. A search for putative PAR binding motif in the sequence of p48 and p58 identified two potential PAR binding sites in p58, one in the N-terminal part (aa 101 to 111) and one in the C-terminal part (aa 286-296) of the protein. To determine whether these sites are functional, binding of DNA primase to PAR was first analyzed by dot blot. As can be seen in this assay PARP-1, XRCC1 and the BRCT1 domain of XRCC1 bound to PAR (Figure 3A), as expected, while no binding was observed to the BRCT2 domain of XRCC1 or to GST. Under the same conditions, p48-p58 interacted with PAR. To identify the domain of the DNA primase responsible for PAR binding, we separated the p48-p58 subunits along with the N-terminal (aa 1 to 266) and C-terminal (aa 266 to 509) part of p58 by SDS-PAGE and analyzed PAR binding using far western blots.

Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane, renatured and incubated with radioactive PAR. As can be seen (Figure 3C) PAR binds only to p58 and specifically to its N-terminal fragment, but not to the p48 subunit.

Next, we wanted to determine whether PAR binding could affect the ability of primase to bind DNA. We first confirmed that recombinant p48-p58 possesses the DNA binding function of the primase by binding radioactive DNA *in vitro* (data not shown, [10]). We then performed *in vitro* competition experiments towards PAR and DNA. Purified p48-p58 DNA primase (1 and 2 μg) was dotted on nitrocellulose, and incubated successively with oligo(dT)₂₀ and radioactively labelled PAR. PAR was able to bind to p48-p58 in absence of preincubation with DNA but addition of unlabelled oligo(dT)₂₀ prior to PAR incubation decreased the intensity of the radiolabeled PAR signal (Figure 3D). Thus, DNA binding prevents the binding of PAR to p58. When the membranes were first incubated with radioactively labelled DNA oligo(dT)₂₀ and then with increasing concentrations of unlabelled PAR, we observed a decrease in the intensity of the radioactive signal retained onto the membrane. This observation indicates that PAR can displace DNA from p48-p58. To confirm this observation, band-shift assays were performed with purified recombinant p48-p58 and single-stranded DNA. Binding of DNA primase to this single stranded template was revealed by electromobility shift. Adding increasing concentrations of PAR (PAR/DNA ratio: 0, 1 to 4x) to the reaction strongly decreased the binding of p48-p58 to DNA (Figure 3E). Altogether these results indicate that PAR can dislodge DNA primase from its template DNA, which suggests that PAR might inhibit DNA primase activity.

To investigate this point, we measured primase activity by following the incorporation of radioactively labelled nucleotide on an oligo(dT)₂₀ DNA substrate in the presence of increasing PAR concentrations (Figure 3F). Low PAR/template DNA ratio had no effect on primase activity, whereas equimolar conditions of PAR and DNA in the reaction strongly inhibited the radioactive nucleotide incorporation. Altogether these results suggest that PAR, by competing with DNA for p58 binding, inhibits DNA primase activity.

BRCT1 overexpressing cells accumulate in S-phase following DNA damage

The inhibition of DNA primase activity by PAR suggests that this polymer may be the primary signal that arrests DNA synthesis at SSBs through interaction with XRCC1-BCRT1 domain. Hence it may be predicted that only the BRCT1 domain of XRCC1 would have a potential to halt DNA replication at DNA damaged site.

To test this possibility different domains of XRCC1 were overexpressed in HeLa cells and the progression through the cell cycle was analyzed by flow cytometry (FACS). The domains of XRCC1, expressed as GST fusion proteins, contained either the N-terminal Pol β binding

domain, the BRCT1 encompassing domains, or the BRCT2 domain. Transfected cells were treated or mock-treated with a monofunctional alkylating agent MNU or MNNG (data not shown) for 30 min. Cells were further grown for 20h in fresh medium. As can be seen in Figure 4A, the cell cycle of non-treated transfected cells, was not affected by overexpression of any XRCC1 fusion protein (Figure 4A, left part). Following treatment with MNU, only cells expressing the BRCT1 fragment of XRCC1 showed a strong accumulation in S phase (Figure 4A, aa 170-428, 282-428 or 314-428) whereas those transfected with fragments 1-170 or 427-633 or expressing GST alone showed almost no cell cycle perturbation. To further analyze this accumulation in S-phase, we quantified the DNA synthesis (BrdU incorporation) versus the DNA content (7-AAD labeling) in cells overexpressing either the BRCT1 (282-428 fragment) fused to GST or GST alone 20 h after treatment with 1 mM MNU (Figure 4B). Even in the absence of damage, an increase in BrdU incorporation was observed in HeLa cells overexpressing GST-BRCT1. After MNU treatment, GST and GST-BRCT1-expressing cells showed an about twofold increase of S phase cells in comparison to the non-treated cells. However, the distribution of cells in S phase was completely different since almost all GST-BRCT1-expressing cells were enriched in the cell cycle just after the G1 exit whereas HeLa cells expressing GST were evenly distributed in all parts of the S phase. The increase of S phase population in the untreated GST-BRCT1 expressing cells, could be due to the endogenous basal level of DNA damage.

Altogether, these results indicate that overexpression of the BRCT1 domain of XRCC1 leads to a strong accumulation of cells treated by alkylating agents in early S-phase. This effect is specific for the BRCT1 domain, since over-expression of GST-BRCT2 had no particular effect on cell cycle progression whether the cells were treated or not with alkylating agents (Figure 4A and data not shown). In addition, overexpression of full length XRCC1 had no effect on cell cycle progression (data not shown), suggesting that the alteration of cell cycle progression observed upon overexpression of BRCT1 results from a dominant effect.

XRCC1-BRCT1 overexpressing cells display increased PAR levels in response to DNA damage.

To further characterize the phenotype of BRCT1 overexpression upon the cellular response to DNA damage, we looked for the poly(ADP-ribosyl)ation status of proteins in HeLa cells expressing GST-BRCT1 or GST-BRCT2 fusion proteins, as poly(ADP-ribosyl)ation is the primary signal, although transient, generated upon induction of SSBs. Cells were treated with 1 mM H₂O₂ for 10 min at room temperature. After 10 min of recovery in fresh medium, poly(ADP-ribosyl)ated proteins were analyzed by Western blot. A strong increase of PARP-1 poly(ADP-ribosyl)ation and a slight modification of GST-BRCT1 were observed in cells treated

with H₂O₂ expressing GST-BRCT1, whereas only a moderate increase of PARP1 poly(ADP-riboyl)ation was observed in cells expressing GST-BRCT2 (Figure 5A). The efficiency of HeLa transfection by GST-BRCT1 or GST-BRCT2 was the same since the expression levels of both proteins were similar, as shown by anti-GST western blotting. In addition, the PARP-1 levels were equivalent in the different transfected cells with or without damage.

As PAR levels were increased in damaged GST-BRCT1 transfected cells, we looked for the *in vivo* distribution of poly(ADP-riboyl)ated proteins in HeLa cells overexpressing XRCC1 domains fused to GFP. Surprisingly, we observed PAR foci in GFP-BRCT1-expressing cells even in the absence of treatment. In addition, a huge increase of PAR foci was visualized after H₂O₂ treatment. These foci clearly colocalized with GFP-BRCT1 foci detected with an anti-GFP antibody (Figure 5B). In contrast, we detected no PAR foci in untreated cells expressing GFP-BRCT2 or in non transfected cells. After H₂O₂ treatment, these cells displayed anti-PAR foci that did not colocalized with GFP-BRCT2 signal. Thus, the observation of increased PAR foci number is specific to the expression of the BRCT1 domain of XRCC1.

Using the laser microirradiation technique to locally introduce single and double strand DNA breaks [18], we observed that GFP-BRCT1 domain was recruited to DNA damage sites like GFP-XRCC1 (Figure 5C) whereas GFP or GFP-BRCT2 were not. We conclude that XRCC1, via its BRCT1 domain, is targeted to damaged DNA, confirming previous results of Okano et al [27].

Altogether, these results indicate that the expression of XRCC1-BRCT1 domain leads to an increase of PAR in damaged cells and to accumulation of this domain at the sites of DNA damage.

XRCC1-BRCT1 slows down DNA synthesis in *Xenopus* egg extracts

To gain insight at the molecular level into the biological significance of the interaction between XRCC1, PAR and the p58 subunit of Pol α -primase during the replication of damaged DNA, we used *Xenopus laevis* egg extracts. The cell-free aspect of this system allows the detailed analysis at the molecular level of the different steps of DNA synthesis and its biochemical manipulation, such as addition of purified proteins, to assess for a dominant effect, or pharmacological drugs, to inhibit specific activities. Introduction of *Xenopus* sperm chromatin in such extracts results in the assembly of a nuclear membrane around DNA and the execution of a single complete round of semi conservative replication [28]. To this end, sperm chromatin treated or not with MMS (see Material and Methods) was introduced into egg extracts synchronized in early S phase and DNA replication was monitored by following the incorporation of a radiolabeled deoxyribonucleotide. Either GST or GST-BRCT1 (aa 307 to 414

from *Xenopus laevis* XRCC1), were added to egg extracts prior to the initiation of DNA synthesis.

As shown in Figure 6A, replication of sperm chromatin treated with low concentrations of MMS was slightly impeded in extracts supplemented with GST as control (about 85% of replication compared to the untreated reaction), confirming that alkylated DNA slows down DNA replication in this system [29]. However, and consistent with what was observed in HeLa cells (Figure 4), replication of MMS-treated chromatin was strongly slowed down only when egg extracts were supplemented with GST-BRCT1 (over 40% reduction of replication Figure 6A and 6C). To further characterize the defect in DNA synthesis induced by the XRCC1-BRCT1 domain, replication intermediates were analyzed by alkaline gel electrophoresis. In this assay, nascent DNA is detected as a smear corresponding to growing DNA chains, while fully replicated DNA is visible as high molecular weight species. As expected, nascent DNA accumulates in the presence of MMS compared to the mocked-treated reaction (Figure 6B, compare right to left panel), which is due to a delay in ongoing DNA synthesis. The addition of GST-BRCT1 resulted in a much stronger accumulation of nascent DNA compared to the GST control, since after 100 min of incubation very little fully replicated DNA was synthesized, while by this time the replication of mock-treated chromatin was almost completed.

The observation that BRCT1 overexpression induces massive PAR synthesis upon DNA damage in HeLa cells (Figure 5) prompted us to examine whether PAR production could also be observed on MMS-treated sperm chromatin in *Xenopus* extracts supplemented with GST-BRCT1. Indeed, PAR production was detectable in nuclei treated with MMS-treated that was dramatically increased by GST-BRCT1 addition (data not shown). This indicates that the BRCT1 domain of *Xenopus* XRCC1 can also act as a dominant polypeptide in egg extracts, by interfering with the formation of nascent DNA strands. If massive PAR production caused by the presence of GST-BRCT1 is responsible for the inhibition of replication, owing to its inhibitory effect on primase function, then this inhibition should be reversed by addition of PARP inhibitor. Figure 6C shows that this is the case, although the maximal concentrations of inhibitor that could be used in the experiment partially rescued the DNA synthesis defect induced by XRCC1-BRCT1. Altogether these results confirm that the BRCT1 domain of XRCC1 inhibits DNA synthesis specifically in the presence of MMS.

XRCC1-BRCT1 binds to chromatin and interferes with formation of functional replication forks

To characterize the DNA synthesis defect induced by XRCC1-BRCT1 in the presence of DNA damage, we analyzed the recruitment to chromatin of replication factors specific of the different steps of DNA synthesis. If XRCC1-BRCT1 induces massive PAR production and

consequent inhibition of DNA primase activity, it is expected that formation of pre-RC and pre-IC should occur normally, but that the initiation step of DNA synthesis should be affected. Hence sperm chromatin was exposed to MMS and incubated in egg extracts synchronized in very early S phase, supplemented with the indicated proteins, as described in Figure 6A. Chromatin fractions were obtained after 60 minutes incubation and analyzed by western blot for the binding of the indicated proteins. In agreement with what observed in HeLa cells (Figure 5C), the XRCC1-BRCT1 domain bound *Xenopus* chromatin, and its chromatin association was enhanced by MMS treatment (Figure 6D). The binding of ORC1, a subunit of the origin recognition complex essential for the assembly of pre-RCs, and that of RPA32, a component of preICs that binds to single stranded DNA generated by the action of the DNA helicase at DNA replication forks, were not affected by the addition of GST-BRCT1, indicating that preRCs and preICs assembled normally. Consistent with this conclusion, the chromatin binding of the preRC component MCM2 was not affected but, on the contrary, it increased following the addition of GST-BRCT1 with or without MMS treatment. On the opposite, PCNA binding was strongly abolished by the BRCT1 domain of XRCC1, but specifically to MMS-treated sperm chromatin (Figure 6D). Since PCNA requires the activity of DNA Pol α -primase to bind to chromatin and stimulates replication elongation, these results strongly argue that the BRCT1 domain of XRCC1 interferes with the initiation step of DNA replication, specifically in the presence of MMS-induced DNA damage. Altogether these results suggest a role for XRCC1 in regulating DNA synthesis, when replication forks encounter a lesion.

DISCUSSION

Several reports put forward the idea that XRCC1 could play a role in dealing with SSBs at the replication fork. The first indication came from the observation that XRCC1 deficient EM9 cells display high levels of SCEs, reflecting the accumulation of unrepaired SSB converted to DBS at collapsed replication forks [2]. Kubota and Horiuchi showed a direct evidence for the requirement of the XRCC1-BRCT1 domain for nascent DNA replication after MMS treatment [4]. While the BRCT2 domain of XRCC1 is only required for BER/SSBR during G1, the BRCT1 domain was shown to be critical for efficient repair during G1 but also S/G2 phase of the cell cycle [30]. Recently, Brem and Hall [31] found that lowering XRCC1 levels by RNA interference led to a significant delay in S-phase progression after exposure to MMS. XRCC1 was shown to interact with PCNA and both proteins displayed colocalization during S phase of

undamaged cells [6]. In addition, Parlanti et al demonstrated the existence of a multiprotein complex containing the DNA replicative polymerases Pol α , δ , ϵ , the replication protein MCM7, BER/SSBR components including XRCC1 and Pol β and the cell cycle regulatory protein cyclin A [32]. They proposed that XRCC1 could act as an early effector of cellular response to DNA breaks at stalled replication. All these studies clearly designed XRCC1 as critical factor acting when replication forks encounter damaged DNA. The idea most commonly advanced was that BER/SSBR machineries are associated to replication machinery in order to coordinate the repair of DNA lesions with replication fork progression, thus avoiding the conversion of unrepaired damaged bases or single strand breaks to mutations or highly toxic DSBs during replication. However, the precise role of XRCC1 in this process remained an open question

In this study, we identified the p58 subunit of the Pol α -primase complex as the key element that links XRCC1 to the replication apparatus. We have demonstrated an interaction between the BRCT1 domain of XRCC1 and the N-terminal part of the p58. Colocalization between XRCC1 and p58 was also observed in damaged cell nuclei suggesting *in vivo* interaction. In addition, we found that the N-terminal domain of p58 bound poly(ADP-ribose), and this binding led to the inhibition of the primase activity. Since XRCC1-BRCT1 domain overexpressed in HeLa cells is poly(ADP-ribosyl)ated following DNA damage, this observation provides an explanation for the accumulation of MNU-treated HeLa cells in early S-phase. We could also observe inhibition of replication of damaged DNA in *Xenopus* egg extracts, suggesting that this mechanism is conserved in vertebrates. Looking more deeply into the mechanism, we find that in the presence of DNA damage the BRCT1 domain of *Xenopus* XRCC1 does not interfere with the formation of both pre-RCs and pre-ICs, but strongly inhibits the association of PCNA with replicating chromatin, suggesting interference with the establishment of functional replication forks and/or ongoing DNA synthesis.

The inhibition of p58 primase activity by PAR in the presence of damaged DNA is strikingly reminiscent of the mechanism very recently described in *Bacillus subtilis* by which guanosine penta- and tetraphosphate ((p)ppGpp) synthesized by RelA in response to nutritional stress, directly inhibits primase activity to stop ongoing DNA replication [33]. It was proposed that this regulation might avoid replication fork collapse during nutrient deprivation and therefore maintain genome integrity. In eukaryotes, PAR may play a similar role in response to DNA damage by alkylating agents during S phase. The implication of PARP-1 and poly(ADP-ribosyl)ation in the replication arrest in response to DNA damage has been previously documented. PARP-1 activity was shown to inhibit the replicative polymerase activities of DNA pol α and pol δ and the DNA repair polymerase activity of pol β *in vitro* [34] [35]. We and others, previously reported the physical interaction between PARP-1 and the 180 kDa catalytic

subunit of DNA pol α -primase, as well as the impaired S-phase DNA synthesis in PARP-1-deficient or depleted mouse embryonic fibroblasts [36] [37]. In our experiments, HeLa cells overexpressing XRCC1-BRCT1 displayed an elevated number of PAR foci, increased PARP-1 and XRCC1-BRCT1 poly(ADP-ribose)ylation under damage conditions, and cells accumulated in early S phase, suggesting a strong inhibition of SSBs repair. In addition, replication of MMS-treated chromatin was largely delayed when GST-BRCT1 was added to *Xenopus* egg extracts, while addition of a PARP inhibitor alleviated the inhibition of chromatin replication, thus highlighting the role of PAR in the replication arrest of damaged chromatin. The inhibition of p53 primase activity *in vitro* by PAR that competes with template DNA points out to a critical step subjected to regulation by poly(ADP-ribose)ylation. Our results shed light into previous observations by Yoshihara et al who reported that PARP-1, in the presence of NAD⁺, could inhibit, *in vitro*, the DNA pol α and the primase activities, which are restored by a PARP inhibitor, suggesting that both the primase and polymerase are directly controlled by PAR. However, increasing PAR levels is probably not sufficient to block primase activity *in vivo*, since PARG deficient HeLa cells generated by RNA interference display high levels of PAR but do not accumulate in early S phase in response to DNA damage (our unpublished results). This points out the need of an appropriate PAR bearing protein, such as XRCC1 through its BRCT1 domain, and suggests that poly(ADP-ribose)ylated XRCC1 is the factor that targets p53 to inhibit replication initiation on damaged template. We believe that the XRCC1-BRCT1 domain acts in a dominant fashion by blocking the progression of replication forks through DNA damage and inhibiting the repair of SSBs as this domain fails to recruit repair proteins to sites of DNA damage.

What is the outcome of the XRCC1-PAR-p53 interaction? The more likely hypothesis is that halting p53 activity could give more time to the cell to repair DNA lesions prior to resume the replication process and thus avoid conversion of SSBs into DSBs. Consistent with this hypothesis, no increase in γ H2AX foci number in XRCC1-BRCT1 expressing HeLa cells was observed, implying that single strand breaks were not converted to double strand breaks (unpublished results). A role for DNA primase to delay the progression of replication when DNA needs first to be mended, is consistent with its role as a molecular brake in DNA replication when leading strand synthesis is prevented from outpacing lagging strand synthesis, as reported for bacteria and T7 bacteriophage DNA replication [38] [39]. As the Pol α -primase complex is required for both the initiation of DNA replication and the discontinuous synthesis of Okazaki fragments, it is therefore a likely target for coupling DNA replication to the DNA damage response [40]. Indeed, Marini et al [41] found that *S. cerevisiae* mutated in the catalytic

primase subunit cannot properly delay entry and progression into S phase in response to DNA damage.

Using *Xenopus* egg extracts, Stokes and Michael [42] suggested the existence of pathway, stimulated by MMS-induced damaged DNA, leading to the activation of a diffusible inhibitor that could block, in trans, chromosomal replication. The downstream effect of this factor was a failure to recruit PCNA, but not Pol α , to the nascent replication fork [29]. Since overexpression of XRCC1-BRCT1 in HeLa cells gives rise to elevated PAR levels and poly(ADP-ribosyl)ation of both PARP1 and XRCC1, we propose that PAR could be a mediator between damaged DNA and replication proteins, via XRCC1-BRCT1 and p58, by preventing, at least temporarily, the elongation step of DNA synthesis.

Interaction between XRCC1 and primase could also help to stabilize stalled replication forks preventing them from collapsing. Subsequently, degradation of PAR from modified BRCT1 could help to stabilize the replication machinery and promotes its reactivation. This hypothesis refers to the work of Maruta et al [43], who proposed that PAR degradation by PARG could be a source of ATP required for replisome stability. If replication fork arrest fail when a SSB is present, leading to the generation of a DSB, another function of XRCC1 will then be turned on, the activation of double-strand end-joining repair, through the interaction and stimulation of the NHEJ factor DNA-PK [11].

In summary, we propose that XRCC1, an essential protein of the BER and SSBR pathways, plays a central role in the coordination of DNA repair and replication during S phase. In response to DNA damage, poly(ADP-ribosyl)ated XRCC1 slows down replication via its functional interaction with the p58 subunit of the Pol α -primase complex in order to allow damage repair to take place or acting, if necessary, as a molecular switch between SSBR and DSBR. The use of the XRCC1-BRCT1 domain may constitute a useful tool to study the metabolism of SSBs in vivo and in vitro.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wished to thank all the members of the Department Intégrité du Génome, especially F. Dantzer, for fruitful discussions. We are especially indebted to M. Mechali for getting us in touch with D. Maiorano and allowing N. Levy to perform experiments in Montpellier's laboratory. This work was supported by funds from Centre National de la Recherche Scientifique, Association pour la Recherche contre le Cancer, Electricité' de France, Ligue contre le Cancer, Commissariat a l'Energie Atomique and Agence Nationale pour la Recherche and by a grant of Health Research Board, Ireland.

REFERENCES

1. Thompson, L.H., and West, M.G. (2000). XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutation research* 459, 1-18.
2. Caldecott, K.W. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2, 955-969.
3. Taylor, R.M., Wickstead, B., Cronin, S., and Caldecott, K.W. (1998). Role of a BRCT domain in the interaction of DNA ligase III-alpha with the DNA repair protein XRCC1. *Curr Biol* 8, 877-880.
4. Kubota, Y., and Horiuchi, S. (2003). Independent roles of XRCC1's two BRCT motifs in recovery from methylation damage. *DNA Repair (Amst)* 2, 407-415.
5. Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., Wilson, S.H., and Yasui, A. (2004). In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13738-13743.
6. Fan, J., Otterlei, M., Wong, H.K., Tomkinson, A.E., and Wilson, D.M., 3rd (2004). XRCC1 co-localizes and physically interacts with PCNA. *Nucleic Acids Res* 32, 2193-2201.
7. Maiorano, D., Lutzmann, M., and Mechali, M. (2006). MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* 18, 130-136.
8. Sclafani, R.A., and Holzen, T.M. (2007). Cell Cycle Regulation of DNA Replication. *Annu Rev Genet*.
9. Bell, S.P., and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry* 71, 333-374.
10. Schneider, A., Smith, R.W., Kautz, A.R., Weisshart, K., Grosse, F., and Nasheuer, H.P. (1998). Primase activity of human DNA polymerase alpha-primase. Divalent cations stabilize the enzyme activity of the p48 subunit. *J Biol Chem* 273, 21608-21615.
11. Levy, N., Martz, A., Bresson, A., Spenlehauer, C., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J. (2006). XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* 34, 32-41.
12. Weisshart, K., Forster, H., Kremmer, E., Schlott, B., Grosse, F., and Nasheuer, H.P. (2000). Protein-protein interactions of the primase subunits p58 and p48 with simian virus 40 T antigen are required for efficient primer synthesis in a cell-free system. *J Biol Chem* 275, 17328-17337.
13. Pestryakov, P.E., Weisshart, K., Schlott, B., Khodyreva, S.N., Kremmer, E., Grosse, F., Lavrik, O.I., and Nasheuer, H.P. (2003). Human replication protein A. The C-terminal RPA70 and the central RPA32 domains are involved in the interactions with the 3'-end of a primer-template DNA. *J Biol Chem* 278, 17515-17524.
14. Rowles, A., Chong, J.P., Brown, L., Howell, M., Evan, G.I., and Blow, J.J. (1996). Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*. *Cell* 87, 287-296.
15. Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 18, 3563-3571.
16. Brizard, J.P., Carapito, C., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., and Brugidou, C. (2006). Proteome analysis of plant-virus interactome: comprehensive data for virus multiplication inside their hosts. *Mol Cell Proteomics* 5, 2279-2297.
17. Richert, S., Luche, S., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., and Rabilloud, T. (2004). About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* 4, 909-916.

18. Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* *10*, 886-895.
19. Dantzer, F., Giraud-Panis, M.J., Jaco, I., Ame, J.C., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C.E., Gilson, E., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., et al. (2004). Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol Cell Biol* *24*, 1595-1607.
20. Grosse, F., Nasheuer, H.P., Scholtissek, S., and Schomburg, U. (1986). Lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase are single-stranded DNA-binding proteins that affect the DNA-polymerase-alpha-primase complex. *European journal of biochemistry / FEBS* *160*, 459-467.
21. Menut, S., Lemaitre, J.M., Hair, A., and Méchali, M. (1988). DNA replication and chromatin assembly using *Xenopus* egg extracts. In *Advances in Molecular Biology: A comparative Methods Approach to the Study of Oocytes and Embryos*, Oxford University Press, Ed J.D. Richter.
22. Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., et al. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* *434*, 917-921.
23. Maiorano, D., Cuvier, O., Danis, E., and Mechali, M. (2005). MCM8 is an MCM2-7-related protein that functions as a DNA helicase during replication elongation and not initiation. *Cell* *120*, 315-328.
24. Maiorano, D., Lemaitre, J.M., and Mechali, M. (2000). Stepwise regulated chromatin assembly of MCM2-7 proteins. *J Biol Chem* *275*, 8426-8431.
25. Vassin, V.M., Wold, M.S., and Borowiec, J.A. (2004). Replication protein A (RPA) phosphorylation prevents RPA association with replication centers. *Mol Cell Biol* *24*, 1930-1943.
26. Francon, P., Lemaitre, J.M., Dreyer, C., Maiorano, D., Cuvier, O., and Mechali, M. (2004). A hypophosphorylated form of RPA34 is a specific component of pre-replication centers. *Journal of cell science* *117*, 4909-4920.
27. Okano, S., Lan, L., Caldecott, K.W., Mori, T., and Yasui, A. (2003). Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol Cell Biol* *23*, 3974-3981.
28. Blow, J.J., and Laskey, R.A. (1986). Initiation of DNA replication in nuclei and purified DNA by a cell-free extract of *Xenopus* eggs. *Cell* *47*, 577-587.
29. Stokes, M.P., Van Hatten, R., Lindsay, H.D., and Michael, W.M. (2002). DNA replication is required for the checkpoint response to damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* *158*, 863-872.
30. Taylor, R.M., Thistlethwaite, A., and Caldecott, K.W. (2002). Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* *22*, 2556-2563.
31. Brem, R., and Hall, J. (2005). XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res* *33*, 2512-2520.
32. Parlanti, E., Locatelli, G., Maga, G., and Dogliotti, E. (2007). Human base excision repair complex is physically associated to DNA replication and cell cycle regulatory proteins. *Nucleic Acids Res* *35*, 1569-1577.
33. Wang, J.D., Sanders, G.M., and Grossman, A.D. (2007). Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell* *128*, 865-875.
34. Eki, T. (1994). Poly (ADP-ribose) polymerase inhibits DNA replication by human replicative DNA polymerase alpha, delta and epsilon in vitro. *FEBS letters* *356*, 261-266.
35. Yoshihara, K., Tanaka, Y., Itaya, A., Kamiya, T., Hironaka, T., Minaga, T. and Koide, S.S. (1989) I. ADP-ribose transfer reactions. Mechanisms and biological significance. Jacobson, M.K. and Jacobson, E.L. Editors. Springer-Verlag. (1989). In vitro evidence for Poly(ADP-ribosylation) of DNA polymerase-primase and phosphorylation of poly(ADP-ribose) synthetase by protein kinase C. 39-46.

36. Dantzer, F., Nasheuer, H.P., Vonesch, J.L., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J. (1998). Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res* 26, 1891-1898.
37. Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Iyer, S., Boulares, H., and Smulson, M.E. (1999). Involvement of PARP and poly(ADP-ribosylation) in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Molecular and cellular biochemistry* 193, 137-148.
38. Lee, J.B., Hite, R.K., Hamdan, S.M., Xie, X.S., Richardson, C.C., and van Oijen, A.M. (2006). DNA primase acts as a molecular brake in DNA replication. *Nature* 439, 621-624.
39. Heller, R.C., and Marians, K.J. (2006). Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature* 439, 557-562.
40. Foiani, M., Lucchini, G., and Plevani, P. (1997). The DNA polymerase alpha-primase complex couples DNA replication, cell-cycle progression and DNA-damage response. *Trends Biochem Sci* 22, 424-427.
41. Marini, F., Pelliccioli, A., Paciotti, V., Lucchini, G., Plevani, P., Stern, D.F., and Foiani, M. (1997). A role for DNA primase in coupling DNA replication to DNA damage response. *Embo J* 16, 639-650.
42. Stokes, M.P., and Michael, W.M. (2003). DNA damage-induced replication arrest in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* 163, 245-255.
43. Maruta, H., Okita, N., Takasawa, R., Uchiumi, F., Hatano, T., and Tanuma, S. (2007). The involvement of ATP produced via (ADP-Ribose)_n in the maintenance of DNA replication apparatus during DNA repair. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30, 447-450.

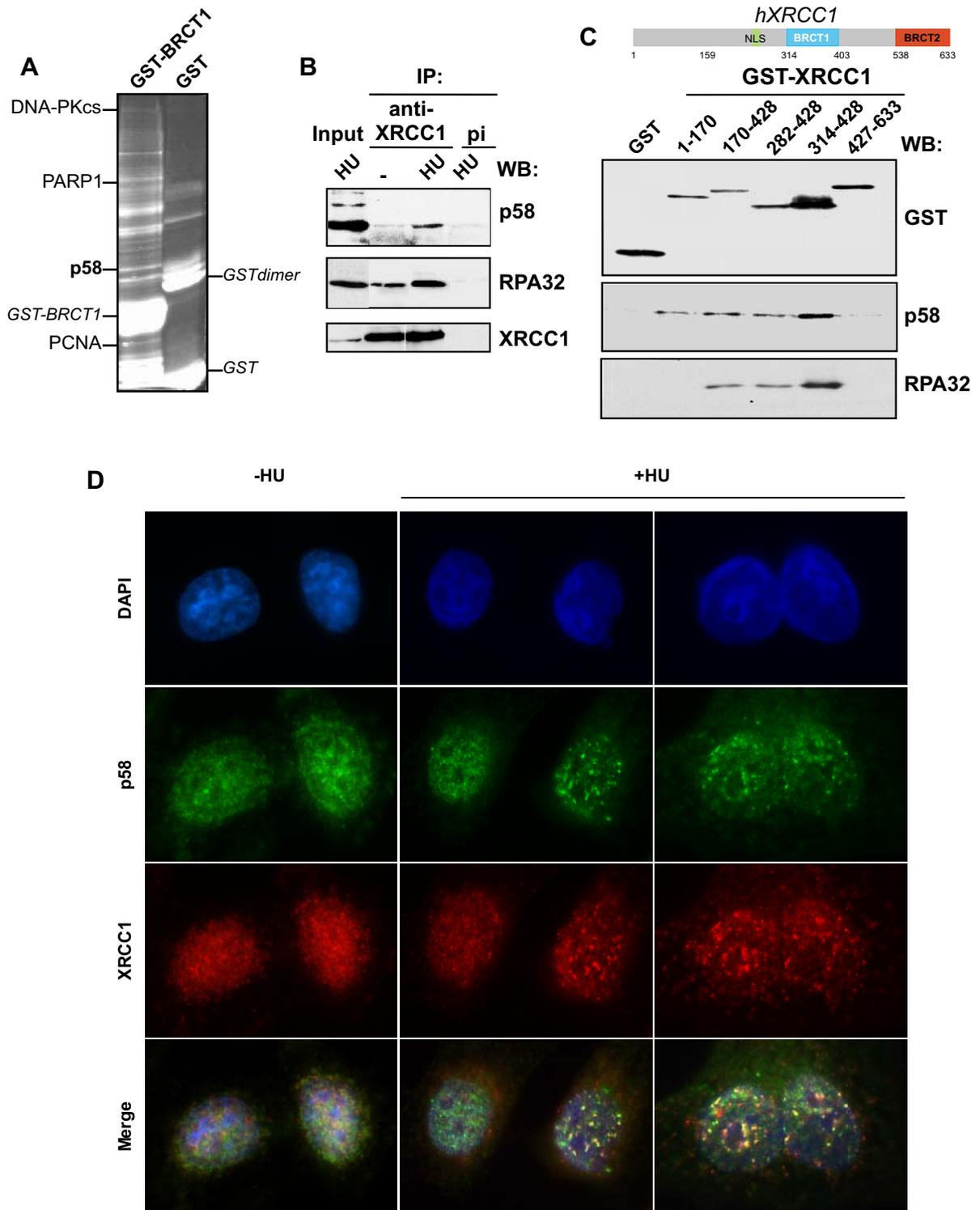


Figure 1

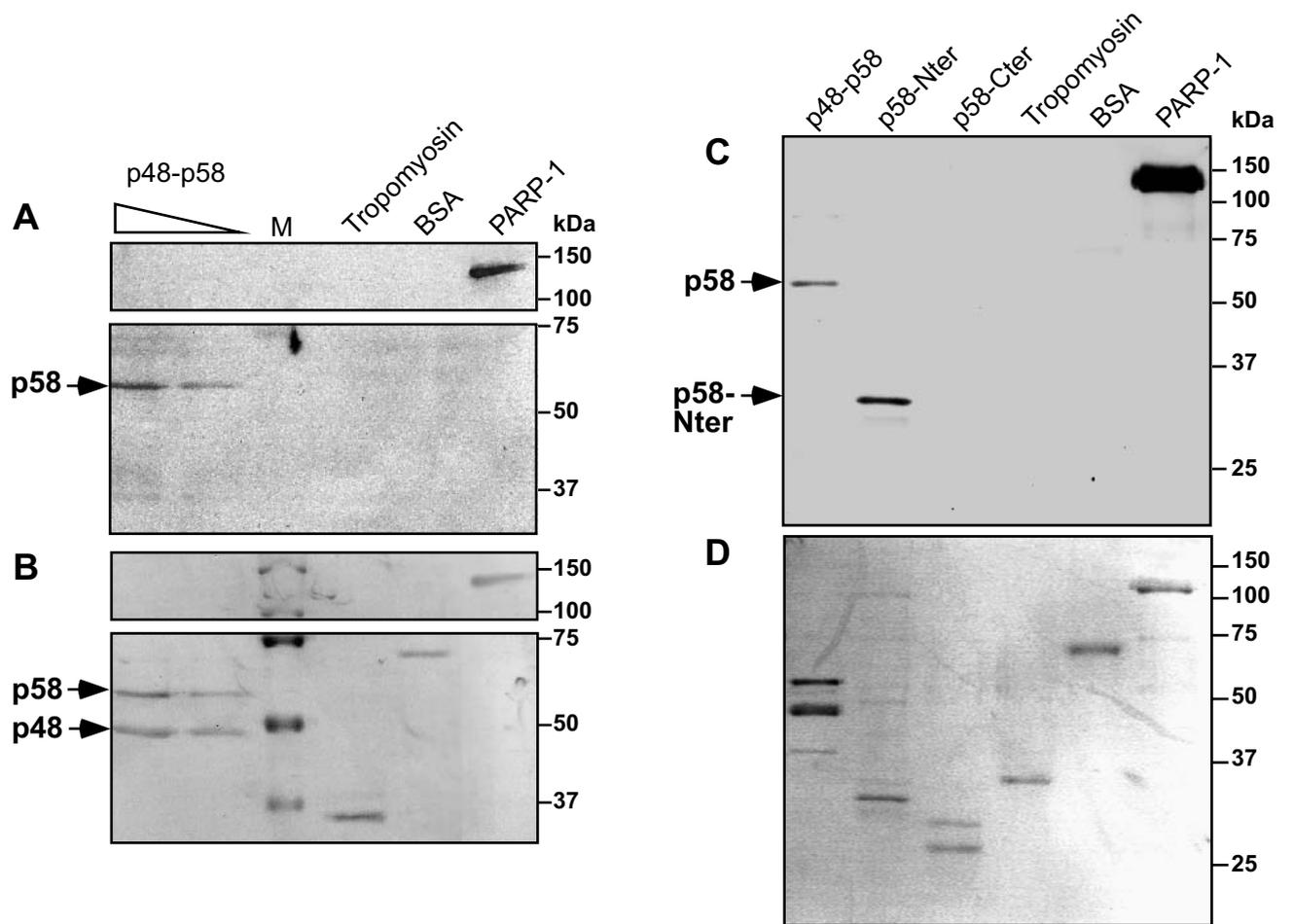


Figure 2

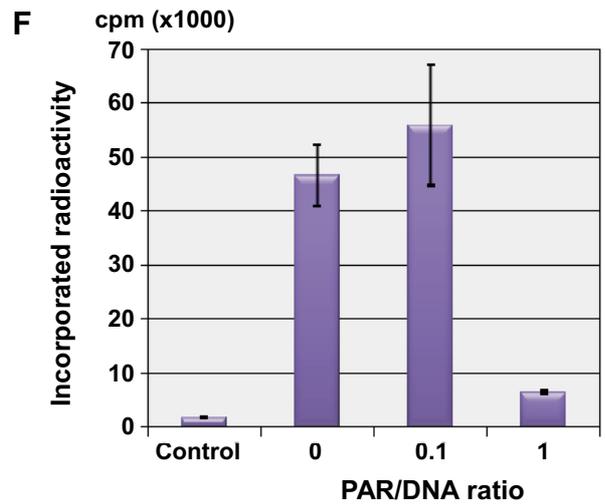
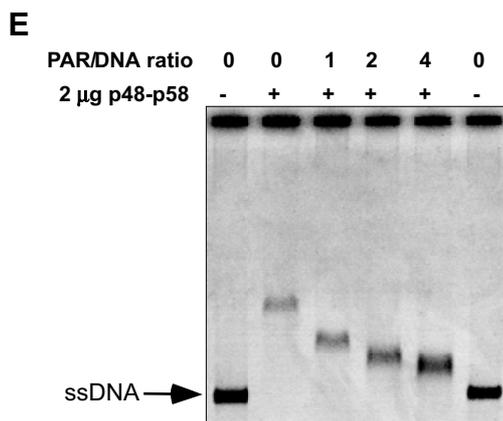
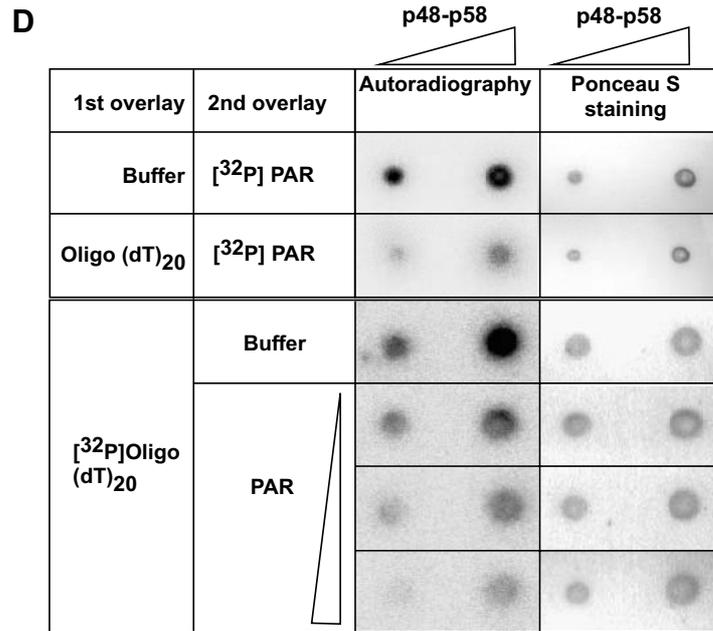
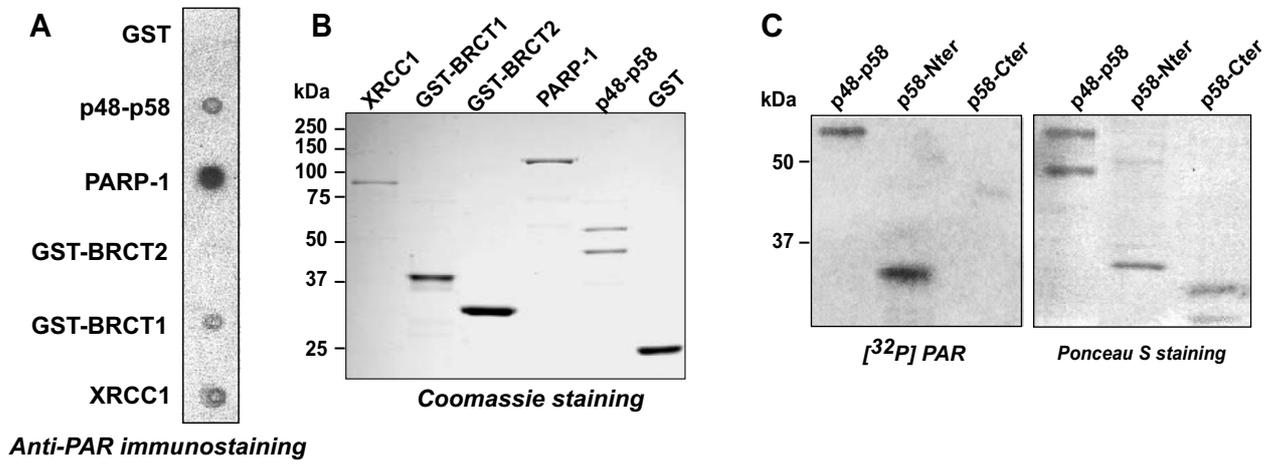


Figure 3

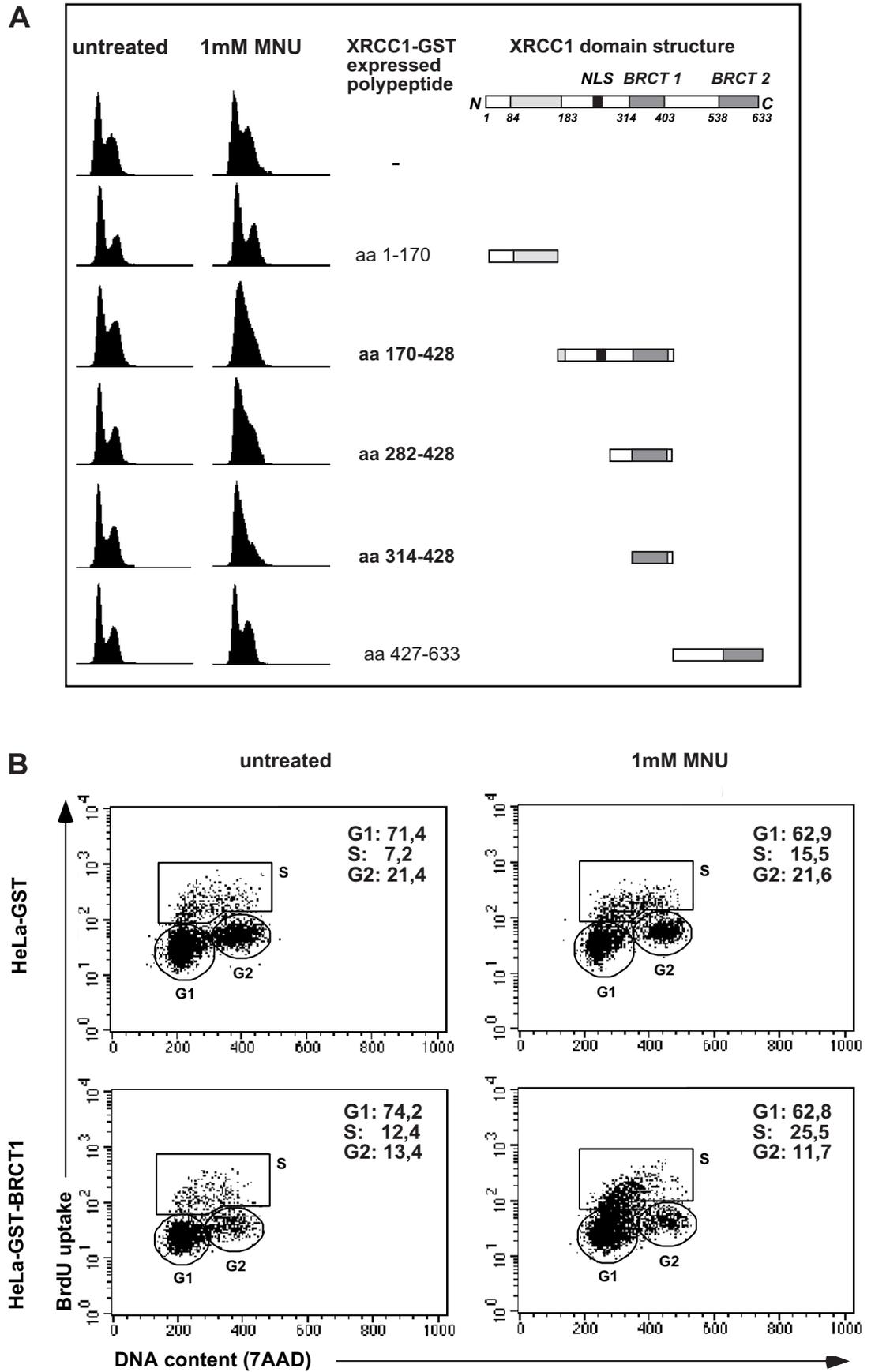


Figure 4

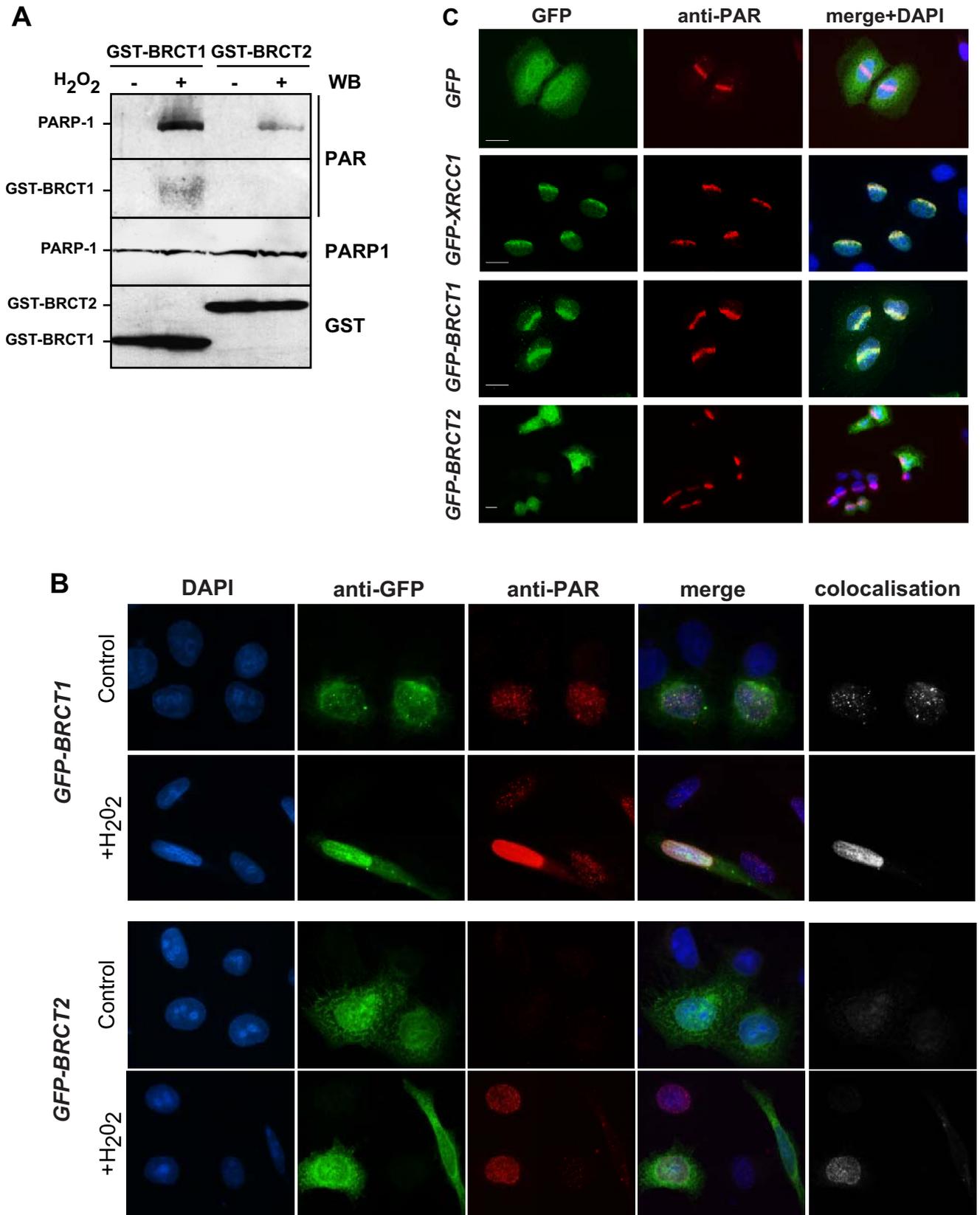


Figure 5

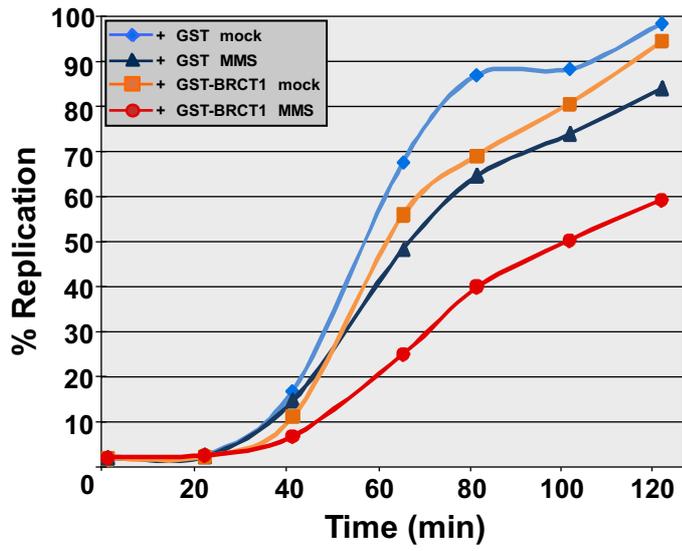
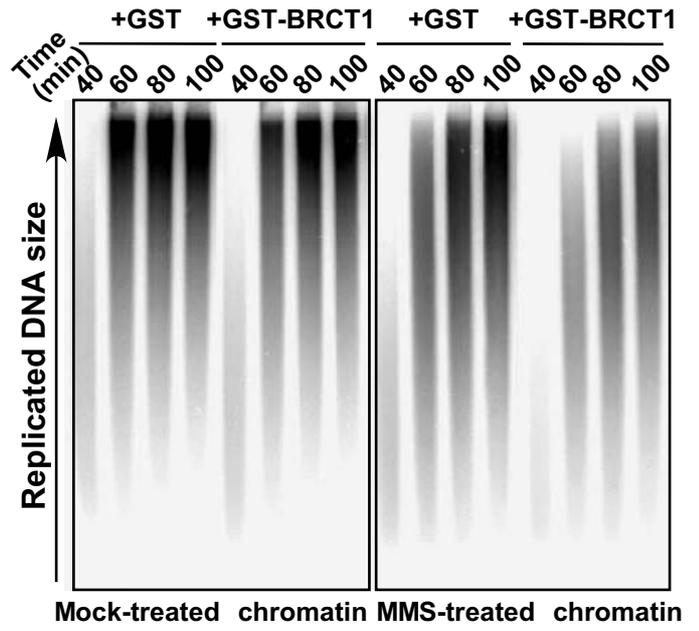
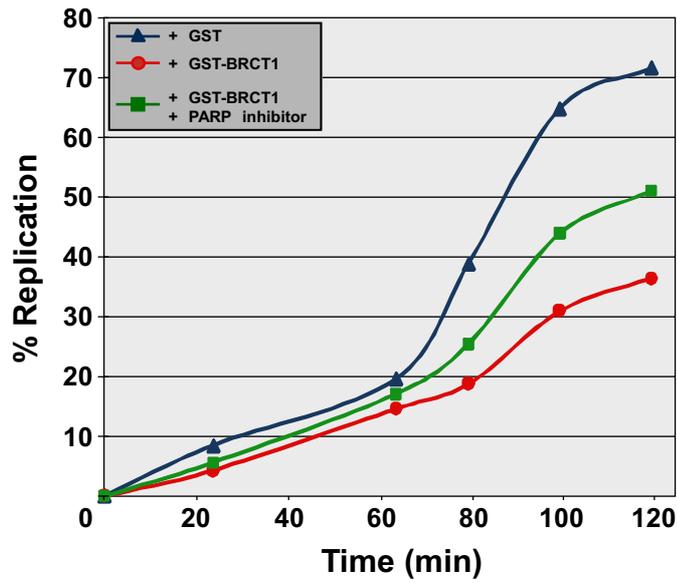
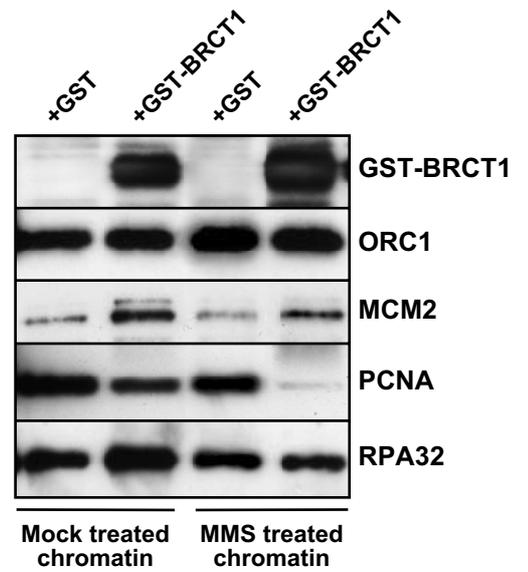
A**B****C****D**

Figure 6

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Interaction between XRCC1 and p58 subunit of Pol α -primase. (A) Identification of proteins interacting with GST-XRCC1-BRCT1 by mass spectrometry. Sypro ruby colored gel of GST pull-down of HeLa cell extracts with GST or GST-BRCT1 fused proteins. (B) Identification of XRCC1-BRCT1 associating proteins by immunoprecipitation. HeLa cells treated with HU 4 mM for 4h or untreated were lysed, then cell lysates were immunoprecipitated with a rabbit polyclonal XRCC1 antibody and western blot was analyzed with rat monoclonal anti-p58, rat monoclonal anti-RPA32 and goat anti-XRCC1 antibodies. Inputs represent 5% of the total proteins used in immunoprecipitation. HU: hydroxyurea, pi: pre immune serum. (C) GST pull-down of p58 or RPA32 with different GST-fused XRCC1 domains. A schematic drawing of XRCC1 together with its domains structure is shown (horizontal bar; numbers indicate XRCC1 aminoacids). (D) Colocalisation by indirect immunofluorescence of XRCC1 and p58 in HeLa cells treated or untreated with hydroxyurea (+ HU: 4 mM 4h and -HU, respectively).

Figure 2: *In vitro* association of XRCC1 with the N-terminal domain of p58. (A, B) Purified p48-His-tagged-p58 expressed in *E. coli* were separated by PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Tropomyosin, BSA and PARP1 were also included as internal negatives and positive controls respectively. The membrane was incubated with purified XRCC1 and revealed with an anti-XRCC1 antibody (A) or amido black stained (B). (C, D) Same experiment with purified His-tagged p58 N-terminal (N_{Ter}) or C-terminal (C_{Ter}) domains (domains were determined by partial tryptic digests and peptide analysis; Schlott and Nasheuer, unpublished data).

Figure 3: p58 binds both DNA and PAR. (A) The indicated purified proteins (1 μ g each) were dot-blotted onto nitrocellulose, incubated with PAR and immunostained with anti-PAR antibody or (B) quantified by coomassie staining of SDS-polyacrylamide gel. (C) Far-western experiment with purified p48-His-tagged p58, p58-N_{ter} or C_{ter} and radiolabelled poly(ADP-ribose). These proteins (2 μ g) are also loaded on polyacrylamide gel and detected by Ponceau S staining. (D) Purified p48-p58 were dot-blotted on nitrocellulose membrane and a first overlay (buffer, radioactively labelled or unlabelled oligo(dT)₂₀) was done prior to a second incubation (radioactively labelled or unlabelled PAR or buffer as indicated) to analyze the competition between PAR and DNA for p58 binding. (E) Band shift assay to analyze complex formation of p48-p58 and ssDNA (ssDNA: Φ X174 single stranded DNA). 2 μ g of purified p48-p58 was

incubated with ssDNA (70ng) and Poly(ADP-ribose) was added in increasing concentration to displace the p48-p58-ssDNA complex. PAR to DNA ratio varied from 0, 1 to 4 excess of PAR. (F) Addition of increasing amounts of PAR to primase assay (ratio 0, 1/10, 1:1) significantly inhibited primase activity

Figure 4: BRCT1 overexpressing cells accumulate in S-phase following DNA damage. (A) Cell cycle analysis of HeLa transfected cells with different fragments of XRCC1 along with the schematic representation of the expressed polypeptides. (B) Flow cytometry profiles of BrdU incorporation (DNA synthesis) versus DNA content (7AAD fluorescence) in HeLa cells transfected either by GST alone or GST-BRCT1 treated or not by MNU.

Figure 5: BRCT1 overexpressing cells display an increased poly(ADP-ribosyl) level in response to DNA damage. (A) Western blot analysis with anti-PAR, anti-PARP1 and anti-GST antibodies in HeLa cells extracts transfected by GST-BRCT1 or GST-BRCT2 treated or not with 1 mM H₂O₂ for 10 min. (B) *In vivo* localisation of PAR foci and BRCT domains of XRCC1 with anti-PAR and anti-GFP antibodies in GFP-BRCT1 or GFP-BRCT2 transfected HeLa cells treated or not with H₂O₂ (as in A). GFP is immunodetected with an anti-GFP antibody to improve GFP detection. (C) GFP-XRCC1 and GFP-BRCT1, but not GFP-BRCT2 or GFP are recruited at local DNA damages induced by laser light microirradiation. Immunofluorescence analysis is performed with anti-PAR and anti-GFP antibodies.

Figure 6: XRCC1-BRCT1 inhibits the initiation of DNA synthesis in *Xenopus* egg extracts. (A) Kinetics of replication of either mock- or MMS-treated chromatin after addition of either purified GST or GST-BRCT1 to egg extracts (B) Size of replication products synthesized in (A) at different times as determined by alkaline gel electrophoresis and subsequent radiography (C) Replication reactions were performed as in (A) with addition of PARP inhibitor (KU0058948, green curve). (D) Western blot of chromatin-associated proteins after 60 min incubation in *Xenopus* extracts treated or not with MMS, in the presence of either GST or GST-BRCT1.

III. Discussion

A) XRCC1 interagit avec la sous unité p58 du complexe ADN polymérase α -primase

Depuis plusieurs années, un rôle pour XRCC1 dans la prise en charge des SSB au niveau de la fourche de réplication est supposé, au regard du phénotype des cellules déficientes en XRCC1 (Thompson et al., 1982) (Thompson and West, 2000), ou de la découverte récente de son interaction avec PCNA (Fan et al., 2004). Dans ce travail, nous mettons en évidence une interaction physique et fonctionnelle nouvelle, *in vitro* et *in vivo*, entre XRCC1 et la sous-unité p58 du complexe ADN polymérase α -primase, grâce à une combinaison de capture GST, d'immunoprécipitation, de far-western blot et d'immunofluorescence. Nous montrons que cette interaction met en jeu le domaine BRCT1 de XRCC1 et la moitié N-terminale de p58. Ce domaine de XRCC1 est connu pour son importance dans les voies de BER/SSBR au cours de phases S/G2 du cycle cellulaire (Taylor et al., 2002), ainsi que pour son rôle dans le redémarrage de la synthèse d'ADN après traitement par un agent alkylant (Kubota and Horiuchi, 2003). L'interaction entre le BRCT1 de XRCC1 et une protéine de la machinerie répllicative n'est donc pas surprenante et pourrait constituer la base d'un système de coordination entre réparation et réplication de l'ADN. Récemment, Parlanti et al. ont isolé de larges complexes multiprotéiques regroupant des facteurs de la réparation de l'ADN comme XRCC1 et des protéines de la machinerie répllicative, telles Pol α (Parlanti et al., 2007).

B) La liaison du poly(ADP-ribose) par p58 inhibe fortement l'activité de l'ADN primase p48-p58

Au cours du BER/SSBR, XRCC1 est rapidement recruté aux sites de lésions grâce à son affinité pour le PAR synthétisé par PARP-1 en réponse aux dommages de l'ADN (El-Khamisy et al., 2003). Son domaine BRCT1 contient un motif de liaison au polymère (Pleschke et al., 2000), et constitue en outre un site d'hétéromodification pour PARP-1 (Schreiber et al., 2002). L'ADN polymérase α , partenaire de PARP-1 au cours des phases S/G2 du cycle cellulaire (Dantzer et al., 1998), peut, elle aussi, être hétéromodifiée par PARP-1 (Simbulan-Rosenthal et al., 1996), ce qui entraîne l'inhibition de son activité *in vitro* (Eki, 1994). Nous avons donc examiné l'affinité de l'ADN primase p48-p58 pour le PAR, et nous

avons montré que seule la sous-unité p58 est capable de lier ce polymère au niveau de sa moitié N-terminale. De plus, cette liaison du PAR par p58 interfère avec sa fixation à l'ADN et elle entraîne une forte inhibition de l'activité primase du complexe p48-p58 *in vitro*. Une inhibition de l'activité primase dans des conditions de poly(ADP-ribosyl)ation a déjà été décrite, mais sans que le mécanisme aboutissant à cette inhibition ne soit explicité (Yoshihara et al., 1989). Nous montrons ici que la liaison électrostatique du PAR sur la sous-unité p58 de l'ADN primase suffit à inhiber son activité *in vitro*, vraisemblablement par compétition avec sa liaison à l'ADN, et que l'hétéromodification covalente de ce complexe n'est pas requise dans ce processus.

C) Les cellules surexprimant le domaine BRCT1 de XRCC1 présentent une activité PARP élevée

Afin de mieux saisir le rôle du domaine BRCT1 de XRCC1 *in vivo*, nous avons surexprimé ce domaine en fusion à la GST dans des cellules HeLa. Nous avons montré par western blot et immunofluorescence que les cellules surexprimant ce domaine BRCT1 présentent une activité PARP significative même en absence de traitement, et qu'après traitement par H₂O₂ les niveaux de poly(ADP-ribosyl)ation des protéines cellulaires augmentent considérablement, se traduisant par une forte automodification de PARP-1 et par l'hétéromodification du domaine BRCT1 de XRCC1. Ce résultat rejoint l'étude réalisée par Keil et al. qui montre que la surexpression de XRCC1 entraîne une augmentation de la synthèse de PAR après traitement des cellules par l'agent alkylant MNNG (Keil et al., 2006). Cette même étude décrit l'interaction physique entre XRCC1 et la poly(ADP-ribose)glycohydrolase (PARG), enzyme chargée du catabolisme du PAR. On pourrait donc imaginer que la surexpression de XRCC1 (ou, dans notre cas, de son domaine BRCT1) pourrait inhiber la PARG, ou tout du moins la détourner de ses autres cibles par un effet de titration. La PARG ainsi complexée à XRCC1 n'agirait plus sur PARP-1, qui se retrouverait alors fortement automodifiée, même en réponse aux faibles niveaux endogènes de lésions de l'ADN. Il a été démontré que l'automodification de PARP-1 inhibe son activité (Ferro and Olivera, 1982) (Zahradka and Ebisuzaki, 1982), ce qui pourrait donc expliquer pourquoi les extraits de cellules surexprimant XRCC1 sont moins efficaces pour catalyser des réactions de poly(ADP-ribosyl)ation que ceux de cellules contrôles (Masson et al., 1998).

D) La surexpression du domaine BRCT1 de XRCC1 entraîne une accumulation des cellules traitées par agent alkylant en début de phase S du cycle cellulaire

Les hauts niveaux de poly(ADP-ribosyl)ation observés dans les cellules surexprimant le domaine BRCT1 de XRCC1 nous ont amené à rechercher un éventuel impact de cette expression sur la progression des cellules à travers le cycle cellulaire, lié à une éventuelle inhibition de l'ADN primase *in vivo*. Nous avons montré par analyse de l'incorporation de BrdU que les cellules surexprimant le domaine BRCT1 de XRCC1 s'accumulent en début de phase S après traitement par un agent alkylant. Cet effet est spécifique du BRCT1 de XRCC1 car la surexpression du domaine BRCT2 ne perturbe pas le cycle cellulaire (résultats non publiés). Cette accumulation des cellules en début de phase S peut refléter soit un blocage au niveau des origines de réplication lors de l'initiation, soit un arrêt précoce de la synthèse d'ADN au cours de l'élongation de la réplication. Ces deux cas de figures sont compatibles avec l'hypothèse d'une action ciblée du PAR sur la primase (figure 21). En effet l'ADN primase est requise au cours de la réplication de l'ADN pour l'initiation de la synthèse du brin continu, ainsi que pour la synthèse des fragments d'Okazaki. De plus, elle agit au niveau de la synthèse du brin continu comme un frein moléculaire, afin d'éviter un découplage avec la synthèse plus lente des fragments d'Okazaki (Lee et al., 2006). Pour ces raisons, elle a été proposée comme cible idéale dans un mécanisme de couplage entre la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN et la réplication des chromosomes (Foiani et al., 1997). Dans notre cas, la présence de fortes quantités de PAR dans les cellules ne suffit vraisemblablement pas à inhiber l'ADN primase. En effet, les cellules dont l'expression de la PARG a été inhibée par ARN interférence présentent des niveaux très élevés de PAR en réponse au traitement par des agents endommageant l'ADN, mais ne s'accumulent pas en phase S (résultats non publiés). Une protéine présentatrice de PAR doit donc certainement être nécessaire et XRCC1, partenaire de p53, poly(ADP-ribosyl)é par PARP-1 en réponse aux dommages de l'ADN est le candidat évident pour ce rôle.

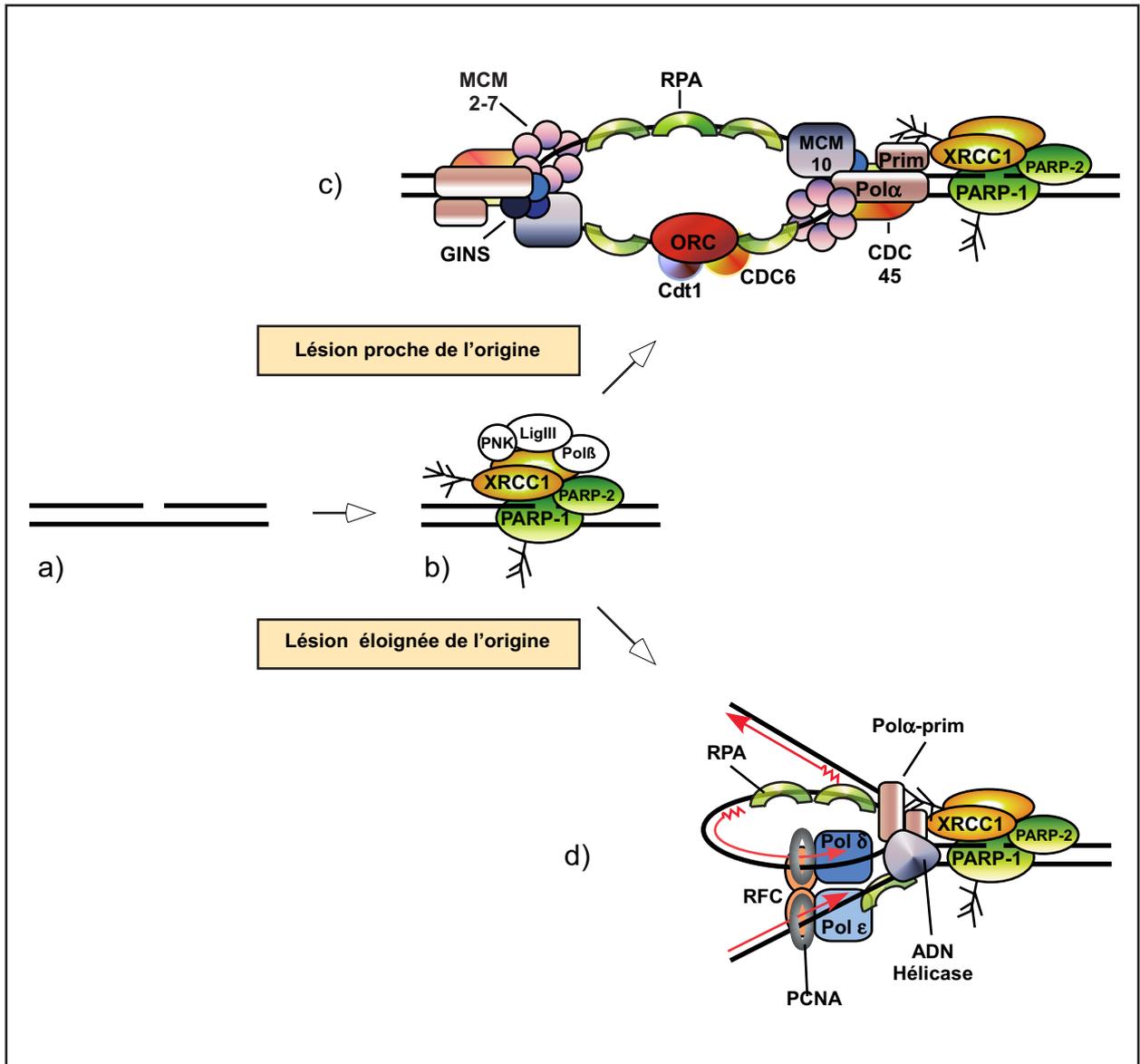


Figure 21 : Modèle du rôle de l'interaction XRCC1/p58 dans le couplage entre la réparation et la réplication de l'ADN

En présence d'une cassure simple-brin de l'ADN (a), XRCC1 est recruté au site de la lésion sur le poly(ADP-ribose) synthétisé par PARP-1 et est hétéromodifié (b).

En phase S, si cette cassure est située à l'immédiate proximité d'une origine de réplication (c), XRCC1 poly(ADP-ribosyl)é bloque la formation d'une fourche de réplication fonctionnelle en inhibant l'ADN primase. Si la lésion est distante de l'origine de réplication (d), XRCC1 inhibe la synthèse des fragments d'Okazaki ou l'avancement de la synthèse du brin continu par son interaction avec p58

E) Le domaine BRCT1 de XRCC1 ralentit la réplication des ADN endommagés en inhibant la formation de fourches de réplication fonctionnelles

Afin d'analyser plus en finesse cet arrêt de la réplication, nous avons utilisé le modèle de la réplication de l'ADN dans les extraits d'ovocytes de *Xenopus laevis*. Nous avons ainsi confirmé que le domaine BRCT1 de XRCC1 entraîne un ralentissement de la réplication des ADN endommagés, montrant que ce mécanisme est probablement conservé chez tous les vertébrés. De plus, l'analyse des protéines réplcatives associées à la chromatine nous a appris que la formation des complexes de pré-initiation n'est pas perturbée, mais que la fixation de PCNA à la chromatine est inhibée. Ces résultats suggèrent que le domaine BRCT1 de XRCC1 interfère avec la formation de fourches de réplication fonctionnelles ou l'avancement de la réplication. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs PARP a permis de réduire cet effet, montrant qu'une activité de poly(ADP-ribosyl)ation est requise dans ce mécanisme. Le fait que les inhibiteurs PARP ne rétablissent pas complètement la cinétique normale de la réplication est imputable au fait que ces inhibiteurs agissent en parallèle sur les mécanismes de BER/SSBR, empêchant la réparation des lésions de l'ADN, et la présence de cette grande quantité de lésions entraîne un ralentissement de la réplication de cet ADN comme précédemment décrit par Stokes et al. (Stokes and Michael, 2003). Dans ce travail est aussi décrite l'existence d'un mécanisme d'inhibition de la réplication des ADN endommagé par traitement à l'agent alkylant MMS, basé sur une molécule capable d'inhiber en *trans* la duplication des chromosomes. Ce mécanisme semble assez similaire à celui que nous décrivons ici, car il repose lui aussi sur un défaut de recrutement de PCNA sur la chromatine, alors que l'ADN primase est recrutée correctement (Stokes et al., 2002).

F) Intérêt biologique du modèle

Nous proposons ainsi que le PAR pourrait agir comme médiateur entre les facteurs de réparation de l'ADN et les protéines de la réplication, *via* l'interaction entre le domaine BRCT1 poly(ADP-ribosyl)é et p58, empêchant temporairement l'élongation de la synthèse d'ADN (figure 21). Ce modèle présente de grandes similitudes avec un mécanisme décrit récemment dans *Bacillus subtilis* où les guanosines tetra- et pentaphosphate ((p)ppGpp), synthétisées en réponse au stress nutritionnel, inhibent directement l'ADN primase pour

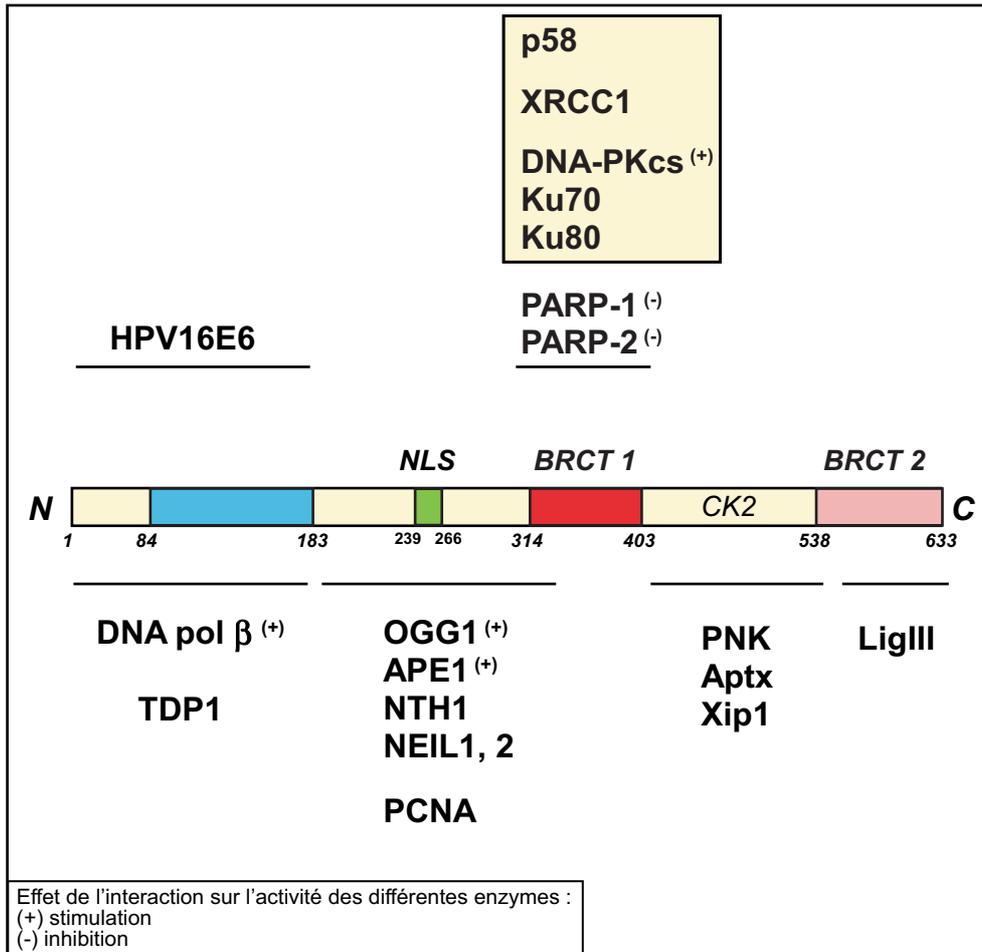
stopper momentanément la réplication de l'ADN (Wang et al., 2007). Il a été proposé que cette régulation permet d'éviter la dissociation des fourches de réplication en cas de privation de nutriments, participant ainsi au maintien de l'intégrité du génome. Chez les eucaryotes, XRCC1 poly(ADP-ribosyl)é pourrait jouer un rôle similaire en réponse au stress génotoxique au cours de la phase S du cycle cellulaire. L'inhibition de l'activité primase et l'arrêt de la réplication en résultant donnerait à la cellule un temps supplémentaire pour réparer les lésions présentes sur l'ADN, avant de réenclencher sa réplication, évitant ainsi la collision entre la machinerie réplivative et la cassure simple-brin de l'ADN. Cela concorde avec le fait que dans les cellules surexprimant le BRCT1 de XRCC1, on n'observe pas de phosphorylation de l'histone H2AX, montrant que les lésions simple-brin n'ont pas été converties en cassures double-brin (résultats non publiés). Les fourches de réplication seraient ainsi stoppées en douceur, le temps que les lésions soient réparées. L'interaction entre XRCC1 et p58 pourrait à cette occasion aider à stabiliser le replisome sur la chromatine, pour éviter que la fourche de réplication arrêtée ne se désassemble. Par la suite, la dégradation par la PARG du PAR porté par le domaine BRCT1 de XRCC1 et son catabolisme ultérieur pourrait fournir une source d'ATP qui aiderait à stabiliser les protéines de réplication sur la chromatine et favoriserait le redémarrage des fourches de réplication (Maruta et al., 2007). En cas d'échec de l'arrêt de la fourche de réplication en amont de la cassure simple-brin, ou en cas de non réparation de la lésion, la fourche finirait par se désassembler, entraînant ainsi la conversion de la cassure simple-brin en cassure double-brin de l'ADN. Une deuxième fonction de XRCC1 serait alors mise en jeu, l'activation d'un mécanisme de réparation des cassures double-brin de l'ADN, grâce à son interaction avec DNA-PK et à sa capacité à stimuler l'activité de cette enzyme dans la recombinaison non homologue (Levy et al., 2006).

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. XRCC1 et PARP-1 dans la coordination entre réparation et réplication de l'ADN

L'ensemble des résultats exposés précédemment décrivent XRCC1 et PARP-1 comme un couple très étroitement lié, intervenant à de multiples niveaux dans les mécanismes cellulaires de la réparation des lésions de l'ADN, et dans sa coordination avec la réplication des chromosomes.

En réponse aux dommages dans l'ADN, La synthèse de PAR par PARP-1 agit à deux niveaux sur le domaine BRCT1 de XRCC1. Dans un premier temps, le PAR permet de recruter XRCC1 aux sites des lésions par le biais d'une interaction électrostatique forte entre des résidus basiques du domaine BRCT1 et le PAR chargé négativement. Par la suite, XRCC1 est hétéromodifié par PARP-1 sur son domaine BRCT1. L'impact de cette modification sur les fonctions de XRCC1 était assez peu connu, mais pourrait participer à la régulation des interactions entre XRCC1 et PARP-1. Nous avons montré ici que XRCC1 poly(ADP-ribosyl)é sur son domaine BRCT1 inhibe l'activité de l'ADN primase par son interaction avec p58 (figures 22 et 23). De son côté, PARP-1 hétéromodifie l'ADN polymérase α , inhibant ainsi l'activité de cette dernière (Simbulan-Rosenthal et al., 1996) (Eki, 1994). L'action commune de XRCC1 et PARP-1 aboutit donc à une inhibition complète du complexe ADN polymérase α -primase, bloquant de manière très efficace l'initiation des origines de réplication ainsi que la progression des fourches de réplication à proximité immédiate des lésions de l'ADN. Ce délai permet aux cassures simple-brin de l'ADN (SSB) d'être réparées et évite une collision directe entre la machinerie réplivative et ces lésions de l'ADN qui pourrait entraîner leur conversion en cassures double-brin (DSB). Un des phénotypes les plus marquants des cellules déficientes en XRCC1 est la fréquence d'échanges de chromatides sœurs (SCE) 12 fois plus élevée que dans les cellules sauvages (Dillehay et al., 1983), observée spontanément ou après traitement par des agents génotoxiques. Ces SCE traduisent la réparation par recombinaison homologue des DSB issues de la dissociation des fourches de réplication au niveau des SSB non réparées au cours de la phase S du cycle cellulaire (Thompson and West, 2000). De manière intéressante, les cellules déficientes en PARP-1 (de Murcia et al., 1997) ou LigIII (Puebla-Osorio et al., 2006) présentent elles aussi des niveaux élevés de SCE (4 fois plus élevés dans les cellules déficientes en PARP-1 et 3



Références:

DNA Polβ	Kubota et al. (1996) EMBO J. 15, 6662-6670
Tdp1	Plo et al. (2003) DNA Repair 2, 1087-1100
HPV E6	Ifner et al (2002) EMBO J 21,4741
PCNA	Fan et al., (2004) Nucl. Acids Res. 32, 2193-2201
PARP-1	Masson et al. (1998) Mol. Cell. Biol., 18 3563-3571
PARP-2	Schreiber et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 23028-23036
APE I	Vidal et al. (2001) EMBO J. 20, 6530-6539
OGG1	Marsin et al. (2003) J. Biol. Chem. 278, 44068-44074
CK2 phosphorylation sites	Loizou et al. (2004) Cell 117, 17-28
PNK	Whitehouse et al. (2001) Cell 104, 107-117
Aptx	Gueven et al. (2004) Hum. Mol. Genet 13, 1081-1093
Xip1	Bekker-Jensen et al. (2007) J.Biol.Cell 282, 19638-19643
DNA Ligase III	Caldecott et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 68-76
NEIL1	Wiederhold et al. (2004) Mol. Cell 15, 209-220
NTH1, NEIL2	Campalans et al; (2005) DNA Repair 4, 826-835
DNA-PK, XRCC1	Lévy et al. (2006) Nucl. Acids Res. 34, 32-41
p58	Lévy et al, soumission à EMBO Journal décembre 2007

Figure 22 : Représentation schématique des domaines de XRCC1 et de leurs interactions protéiques.

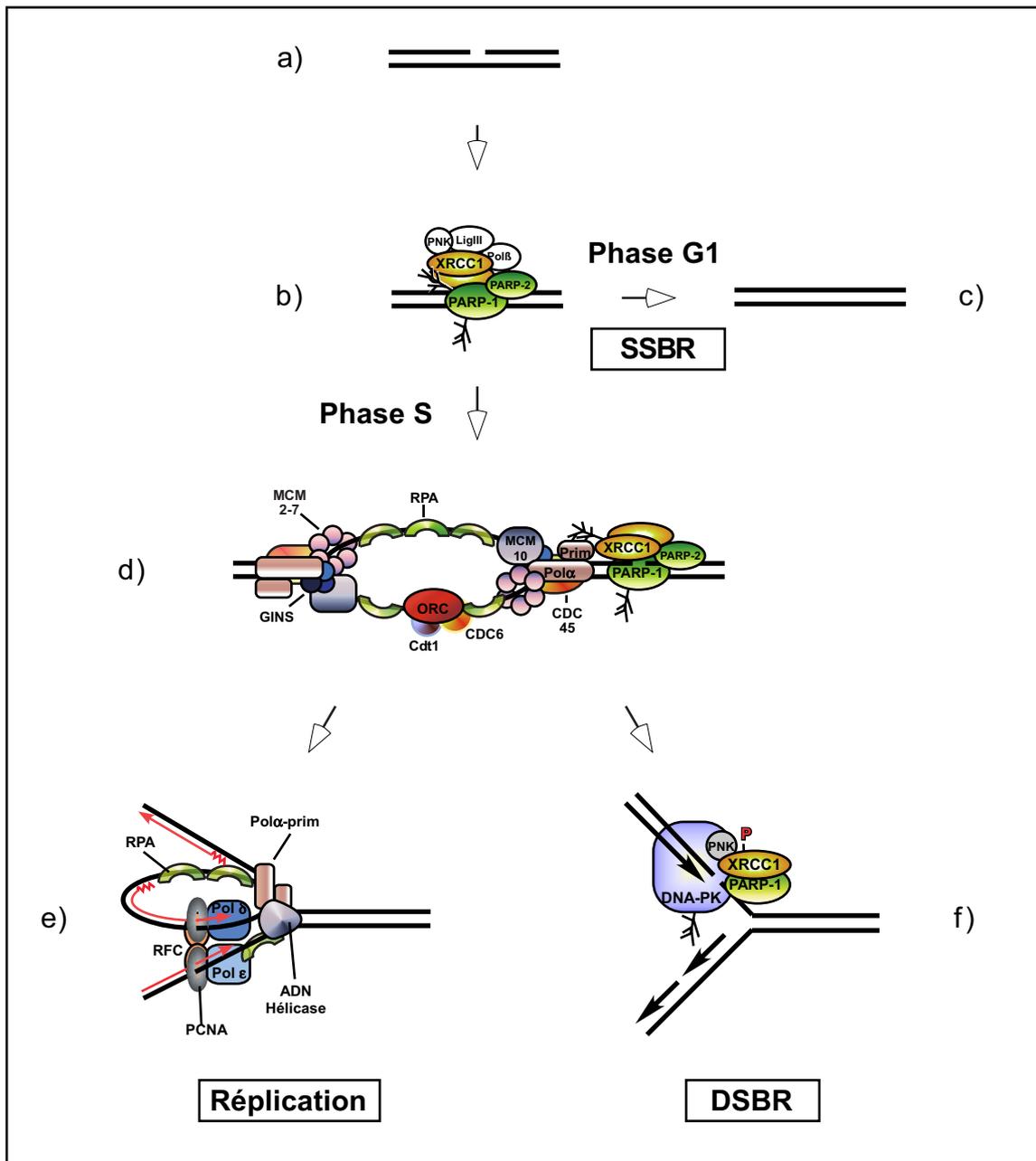


Figure 23 : XRCC1 et PARP-1 dans la coordination entre réparation et réplication de l'ADN.

En phase G1 du cycle cellulaire, les cassures simple-brin (SSB) de l'ADN (a) sont détectées par PARP-1 qui s'active et synthétise un polymère d'ADP-ribose (PAR). XRCC1 est recruté sur le PAR (b) et organise les différentes étapes de la réparation des cassures simple-brin, le SSBR (c).

En phase S, PARP-1 et XRCC1 (PAR)ylé inhibent le complexe ADN polymérase a-primase aux origines de réplication voisines (d) afin de ralentir la réplication le temps que les lésions de l'ADN soient résolues.

Une fois les cassures réparées, la réplication de l'ADN reprend (e).

Si l'arrêt des fourches de réplication échoue, ou si la réparation des lésions est impossible, les SSB sont converties en cassures double-brin de l'ADN (DSB) et le couple XRCC1/PARP-1 stimule DNA-PK afin d'activer la signalisation cellulaire et la réparation des DSB (DSBR) par NHEJ.

fois plus élevés dans les cellules déficientes en LigIII que dans les cellules sauvages), mais bien en dessous de ceux observables dans les cellules déficientes pour XRCC1. Cela illustre bien le fait que XRCC1, en plus d'être impliqué dans la réparation des SSB, a un rôle important dans la gestion de ces lésions au cours de la réplication de l'ADN. Ce mécanisme mettant aussi PARP-1 en jeu, la fréquence plus faible de SCE dans les cellules déficientes pour cette protéine pourrait alors être attribuée à la redondance des fonctions entre PARP-1 et PARP-2 (Schreiber et al., 2002) (Menissier de Murcia et al., 2003).

II. XRCC1 et PARP-1 dans la transition entre SSBR et DSBR

Une explication supplémentaire au taux élevé de SCE des cellules déficientes pour XRCC1 peut être fournie par la capacité qu'a le couple XRCC1/PARP-1 à diriger la réparation des cassures double-brins (DSBR) générées lors de la collision entre la machinerie répllicative et des SSB vers une voie dépendante de DNA-PK, la recombinaison non-homologue (la NHEJ), et non vers la recombinaison homologue (RH) (voir figure 23). Il est couramment admis qu'au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire, la réparation des DSB est effectuée par RH. Néanmoins il a été démontré que le NHEJ est actif tout au long du cycle cellulaire, et qu'il est prédominant par rapport à la recombinaison homologue en début de phase S du cycle cellulaire (Rothkamm et al., 2003). De plus, Burma et al. ont démontré qu'au cours de la phase S du cycle cellulaire, les DSB générées par dissociation de la fourche de réplication sur un ADN endommagé entraînent rapidement une forte activité DNA-PK, traduite notamment par la phosphorylation de l'histone H2AX (Burma and Chen, 2004). Ainsi les DSB associées à la réplication de l'ADN sont préférentiellement réparées par un mécanisme dépendant de DNA-PK, à l'inverse des DSB générées directement par les radiations ionisantes. Par ailleurs, il a été suggéré dans ce même article que la rapidité de la réponse de DNA-PK au niveau de ces lésions pourrait traduire un lien avec la machinerie répllicative. Nous avons montré ici que ce lien pourrait en réalité être réalisé par XRCC1 lors de la conversion de SSB en DSB, puisqu'il a la capacité de stimuler l'activité de DNA-PK (figures 22 et 23). De plus, il a été montré que PARP-1 interagit aussi avec DNA-PK et peut poly(ADP-ribosyl)er cette dernière, stimulant de la sorte cette kinase (Ruscetti et al., 1998), ce

qui appuie encore l'étroite relation entre XRCC1 et PARP-1 dans cette coordination entre réparation et réplication de l'ADN. Suite à cette stimulation par le couple XRCC1/PARP-1, DNA-PK phosphoryle de nombreuses cibles comme PARP-1 (Ariumi et al., 1999) ou XRCC1, entraînant ainsi la monomérisation de cette protéine et permettant le recrutement des effecteurs du DSBR.

Alternativement, dans un contexte où DNA-PK fait défaut, le couple XRCC1/PARP-1 accompagné de LigIII pourrait catalyser la réparation de ces DSB dans un mécanisme de NHEJ alternatif, le B-NHEJ (Audebert et al., 2004).

III. XRCC1 et PARP-1 dans les thérapies contre le cancer

La grande majorité des thérapies de lutte contre le cancer est basée sur l'induction massive de lésions dans l'ADN des cellules tumorales, par irradiation ou par traitement avec des drogues génotoxiques. Mais beaucoup de ces traitements s'avèrent avoir des effets secondaires importants, de par leur toxicité pour l'ensemble des cellules de l'organisme. De plus, certains types de tumeurs présentent des résistances importantes à ces agents. Dans ce contexte, une des solutions les plus prometteuses actuellement est l'inhibition des voies de réparation de l'ADN afin de potentialiser l'effet des thérapies. Idéalement, les voies de réparation des cassures simple- et double-brin de l'ADN doivent être inhibées simultanément afin d'obtenir un effet optimal. L'accumulation des lésions non réparées dans l'ADN des cellules tumorales entraîne alors leur mort. La capacité qu'ont les protéines du SSBR XRCC1 et PARP-1 à interagir d'une part avec la machinerie répliquative (p53 et pol α) et d'autre part avec la machinerie du DSBR (DNA-PK) fait de ce couple un élément fondamental de la coordination entre réparation et réplication de l'ADN. Il constitue à ce titre une cible idéale pour l'élaboration de molécules anticancéreuses.

Diverses études ont déjà été réalisées sur l'utilisation d'inhibiteurs PARP dans les traitements anti-tumoraux. Deux études ont montré l'effet important de l'utilisation de telles molécules dans un contexte de cancers liés à des mutations des gènes codant pour BRCA1 ou BRCA2 (Farmer et al., 2005) (Bryant et al., 2005). En effet, ces deux facteurs sont essentiels

à la réparation des DSB par RH et leur mutation entraîne une prédisposition au développement de cancers. Les tumeurs déficientes pour ces protéines sont donc incapables d'utiliser cette voie de réparation des DSB (Tutt and Ashworth, 2002) mais, en revanche, les cellules saines des patients portant cette mutation du gène BRCA1/BRCA2 conservent un allèle fonctionnel de ces protéines et sont donc compétentes pour cette voie de réparation des DSB. L'inhibition des voies de SSBR/BER par l'utilisation d'inhibiteurs PARP entraîne la persistance des SSB et leur conversion en DSB au cours de la réplication.

Notre travail nous permet de mieux comprendre cet effet important de l'inhibition de l'activité PARP dans des cellules incompetentes pour la réparation des DSB par RH. De tels inhibiteurs vont non-seulement affecter la réparation des lésions simple-brin de l'ADN, mais aussi leur prise en charge au cours de la réplication et la réparation ultérieure par NHEJ des DSB générés de la sorte. Sous l'effet des inhibiteurs PARP, les tumeurs associées à un défaut des protéines BRCA1/BRCA2 se retrouvent donc avec des niveaux très élevés de DSB et une viabilité très nettement réduite. Il a ainsi été démontré que le traitement de telles cellules tumorales par un inhibiteur PARP diminue considérablement leur viabilité face à l'apparition spontanée de lésions dans l'ADN (Farmer et al., 2005) (Bryant et al., 2005). De la même manière, l'administration d'inhibiteurs PARP à des souris inhibe la formation de tumeurs après injection de cellules tumorales déficientes pour BRCA2 (Farmer et al., 2005), et favorise l'élimination de xénogreffes de tumeurs associées à une mutation de cette même protéine (Bryant et al., 2005). En dehors de ce contexte spécifique aux tumeurs associées aux mutations de BRCA1 ou BRCA2, les inhibiteurs PARP présentent un intérêt dans la potentialisation du traitement de nombreuses tumeurs. De nombreuses lignées cellulaires tumorales présentent des niveaux élevés d'expression de PARP-1 qui pourraient être à l'origine de la résistance de ces cellules aux traitements classiques par agents génotoxiques (Ratnam and Low, 2007). Les inhibiteurs PARP permettent ainsi de sensibiliser les cellules tumorales aux traitements par des agents induisant des lésions dans l'ADN qui sont normalement réparées par les mécanismes de BER/SSBR tels que le temozolomide (Calabrese et al., 2004) ou le cis-platine (Nguewa et al., 2006), ainsi que dans les radiothérapies (Noel et al., 2006). Différents inhibiteurs PARP sont ainsi en cours d'essais cliniques et pourraient être utilisés couramment dans les traitements anticancéreux d'ici quelques années (Ratnam and Low, 2007).

De manière similaire, on pourrait imaginer interférer avec les fonctions de XRCC1 pour inhiber le SSBR, la coordination entre réparation et réplication de l'ADN ainsi que la réparation par NHEJ des DSB générés au cours de la réplication, afin de potentialiser les thérapies anticancéreuses. Le rôle spécifique du domaine BRCT1 de XRCC1 dans la survie des cellules en phase S/G2 du cycle cellulaire après traitement par des agents génotoxiques (Taylor et al., 2002) pourrait même permettre de cibler précisément les cellules tumorales en prolifération et d'éviter les effets génotoxiques non désirés sur les cellules quiescentes du reste de l'organisme. Pour arriver à inhiber spécifiquement les fonctions du domaine BRCT1 (telles la dimérisation de la protéine, la liaison à PARP-1, à p58 et à DNA-PK) deux types de stratégies sont envisageables : l'utilisation d'aptamères, ou celles de peptides en dominant négatif.

Les aptamères sont des courts oligonucléotides d'ARN ou d'ADN, capables d'adopter une conformation tridimensionnelle stable *in vivo*, et de se lier de la sorte avec une haute affinité et une grande spécificité sur des protéines. Des telles molécules ont déjà été élaborées et utilisées *in vitro* et *in vivo* dans le traitement de cellules cancéreuses. L'inhibition du facteur de transcription NF- κ B par un aptamère permet ainsi de supprimer la résistance à la doxorubicine de cellules de cancer du poumon (Mi et al., 2007). Un autre aptamère est également en cours d'étude clinique dans le cadre de traitement de divers types de cancers (Ireson and Kelland, 2006). L'élaboration d'un aptamère se liant spécifiquement au domaine BRCT1 de XRCC1 permettrait ainsi d'empêcher la dimérisation de la protéine, ou ses interactions avec les différents partenaires des complexes du SSBR, de la réplication de l'ADN, ou du DSBR, et ainsi compromettre sérieusement la survie des cellules traitées.

Une autre possibilité serait l'utilisation de peptides se liant en dominant négatif au domaine BRCT1 de XRCC1, qui interdiraient les interactions de ce domaine avec ses différents partenaires. Une telle approche a été utilisée pour inhiber et étudier les fonctions de BRCA1. Le peptide BIF (BRCA1 Inhibitory Fragment) a ainsi été construit à partir de la séquence de l'ARN hélicase A, partenaire de BRCA1, et se lie fortement aux domaines BRCT à l'extrémité C-terminale de la protéine (Schlegel et al., 2003). Sa surexpression perturbe fortement la localisation cellulaire de BRCA1 ainsi que ses fonctions physiologiques (Ko et al., 2006). On pourrait donc aisément imaginer un peptide se liant au domaine BRCT1 de XRCC1 à partir de la séquence d'un de ses nombreux partenaires, par exemple p58, afin de

compromettre spécifiquement les fonctions de la protéine dans le couplage entre réparation et réplication de l'ADN, ainsi que dans la stimulation de la réparation par NHEJ des DSB générés au cours de la réplication.

De manière générale, cibler les fonctions multiples du couple XRCC1/PARP-1 semble être une stratégie efficace pour potentialiser les traitements anti-tumoraux, et l'utilisation combinée d'inhibiteurs PARP et de molécules abolissant les fonctions de XRCC1 pourrait permettre d'augmenter de manière synergique l'efficacité des thérapies.

ANNEXE TECHNIQUE

Cette annexe a pour but de présenter en détails les matériels et méthodes spécifiques aux différents travaux exposés dans cette thèse.

I. Test d'activité kinase pour DNA-PK

Ce test a été élaboré afin d'analyser l'influence d'une protéine sur l'activité kinase de DNA-PK in vitro.

Les oligonucléotides sens : 5'-AATTAGAACCTCCACTTTCTCAAGAAGCTTTCGCT-GATCTTTGGAAGAAAC-3' et antisens : 5'-TCGAGTTTCTTCCAAAGATCAGCGAAA-GCTTCTTGAGAAAGTGGAGGTTCT-3' correspondant aux acides aminés 11 à 25 de p53 ont été hybridés puis clonés en fusion avec la Gluthathione-S-Transférase (GST) entre les sites EcoRI et XhoI du vector d'expression procaryote pGEX 4T (GE Healthcare). Le peptide a ensuite été exprimé dans *E.coli* puis purifié par capture GST. Il constitue un substrat de phosphorylation pour DNA-PK, car sa séquence contient l'équivalent de la Ser15 de p53, cible *in vitro* et *in vivo* de cette kinase.

Un µg du peptide GST-p53 Ser15 est mélangé à différentes quantités de XRCC1 ou des différents domaines de cette protéine dans un tampon d'activité kinase (50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT 1 mM ATP, 10 µg/mL ADN activé à la DNase de thymus de veau) et à 20 unités de DNA-PK (Promega). La réaction est conduite 10 min à 30°C et stoppées par addition de tampon de Laemmli. Les protéines sont ensuite séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose (Schleicher & Shul), et l'activité kinase de DNA-PK est visualisée grâce à un anticorps monoclonal de souris anti phospho-p53(Ser15) (Cell Signaling).

II. Far-western blot

Cette technique a pour but de mettre en évidence une interaction physique directe entre protéines purifiées (ou non) et XRCC1.

Les protéines sont séparées par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), puis renaturées dans le gel pendant 1h à température ambiante dans un tampon

de renaturation (50 mM Tris pH 7.5, 20% glycérol). Les protéines sont transférées sur membrane de PVDF pendant 80 min à 250 mA dans un tampon de transfert (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glycine, 20% EtOH) et la membrane est saturée la nuit à 4°C dans un tampon de blocage n°1 (50mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.3% Tween20, 5% lait). La membrane est ensuite incubée dans le tampon de blocage contenant 3 µg/mL XRCC1, pendant 1h à température ambiante, puis lavée 3 fois 10 min dans un tampon TBS-T (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.3% Tween20). La membrane est alors saturée 1h à température ambiante dans un tampon de blocage n°2 (TBS-T 1x, 5% lait), incubée 2h à température ambiante avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin Roman anti-XRCC1 (Alexis Biochemicals) dilué à 1/5000 dans du TBS-T additionné de 3% lait (TBS-TL), lavée 3 fois 10 min dans du TBS-T, incubée 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin (Sigma-Aldrich) dilué à 1/20000 dans du TBS-TL puis lavée 3 fois 10 minutes dans du TBS-T. Les interactions protéiques sont alors révélées en utilisant les réactifs ECL+ (GE Healthcare) et visualisées par autoradiographie sur film Biomax MR (Kodak).

III. Synthèse de poly(ADP-ribose)

Synthèse à grande échelle de poly(ADP-ribose) (PAR) pour les expériences de liaison au PAR et d'activité primase.

La préparation et l'utilisation du PAR se fait uniquement en tubes siliconés, car ce polymère s'adsorbe fortement sur les plastiques.

La synthèse de PAR est conduite en incubant 50 µg de PARP-1 purifiée pendant 30min à 25°C dans 2 mL de tampon d'activité PARP (50 mM Tris pH 8, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM DTT, 0.2 mM NAD, 50 µg/mL BSA, 2 µg/mL ADN activé). Le mélange est ensuite incubé 1h à 37°C avec 2 µM CaCl₂ et 20 µg/mL DNaseI afin de dégrader les ADN, puis les protéines sont digérées par un traitement de 4h à 37°C avec 100 µg/mL protéinase K en présence de 0.1% SDS. Le PAR est enfin purifié par extraction phénol/chloroforme et précipitation éthanolique, repris dans 200 µL d'eau distillée et sa concentration est déterminée grâce à son absorbance à 260 nm (1 DO_{260nm} = 40 µg/mL).

IV. Test d'activité primase

Ce test permet de mesurer l'activité de synthèse d'ARN de l'ADN primase p48-p58 par l'incorporation d'un ribonucléotide radiomarké.

Le dimère p48-Hisp58 cloné dans le vecteur d'expression procaryote pET-11 est exprimé dans *E.coli* et purifié par chromatographie d'affinité sur résine de nickel.

Une unité enzymatique d'ADN primase p48-p58 est incubée avec 0.1 mM oligo (dT)₂₀ (concentration du nucléotide) et 10 µCi [α ³²P]ATP dans un tampon d'activité (10 mM Tris Ac pH 7.3, 10 mM MgAc, 1 mM DTT and 0.1 mg/mL BSA) pendant 15 min à 37°C. Les échantillons sont ensuite déposés sur de filtres de DEAE cellulose DE81 (Whatman), les filtres sont lavés 4 fois 10 minutes dans un tampon de lavage (0.4 M bicarbonate d'ammonium, 1% PPI), rincés deux fois à l'eau distillée puis séchés. La quantité de radioactivité incorporée est mesurée par comptage en scintillation.

V. Analyse du cycle cellulaire par incorporation de BrdU

Les cellules HeLa (5.10^5) sontensemencées dans des boîtes de Petri de 10cm dans un milieu de culture DNEM complété avec 10% sérum fœtal bovin et 0.5% gentamicine. La transfection des cellules est effectuée avec le réactif JetPEI (Polyplus Transfection). Si nécessaire, un traitement de 30 min à 37°C avec 1 mM MNU (Sigma-Aldrich) est effectué, puis les cellules sont lavées au PBS et cultivées pour 20 h dans du milieu frais. Les cellules sont ensuite incubées 30 min à 37°C en présence de 5 µM BrdU (Sigma-Aldrich) afin de marquer la synthèse d'ADN. Après deux lavages au PBS, les cellules sont détachées par trypsination, lavées au PGE (PBS 1X, 1g/L glucose, 1 mM EDTA) et fixées pendant 30 min sur glace dans de l'éthanol 70%. Les cellules sont ensuite culotées, et réhydratées pendant 4 h à 4°C dans 5 mL de tampon PGE, puis traitées 15 min à température ambiante avec HCl 2N (dans PGE). Les cellules sont culotées, resuspendues dans 2 mL de tampon de neutralisation PTTB (PBS 1x, 0,5% Tween20, 0,5% BSA, 0,1 M sodium tetraborate) puis lavées deux fois dans le tampon PTB (PBS 1x, 0,5% Tween20, 0,5% BSA). Après incubation 1 h à température

ambiante avec les anticorps primaires monoclonal de souris anti-BrdU (Becton Dickinson) dilué au 1/3 et polyclonal de lapin anti-GST (Sigma) dilué au 1/2000, les cellules sont lavées deux fois au PBS, puis incubées 1 h avec les anticorps secondaires de chèvre anti-souris couplé au fluorophore Alexa 488 (Invitrogen) dilué au 1/500 et d'âne anti-lapin couplé à la phycoérythrine (Jackson Immuno Research) dilué au 1/200. Après deux lavages PBS, les cellules sont reprises dans du tampon PGE additionné de 10 µg/mL 7-Aminoactinomycin-D (7-AAD, Sigma). L'analyse des cycles cellulaires et de la réplication de l'ADN est réalisée sur un compteur FACS Calibur à l'aide du logiciel Cell Quest (Becton Dickinson).

VI. Etude de la réplication de l'ADN dans les extraits d'œuf de *Xenopus laevis*

1) Préparation des extraits d'œufs de xénope

La ponte des œufs est provoquée artificiellement par injection de 200 unités d'hormone gonadotrophique chorionique humaine à h-24 puis 600 unités à h-16. Après la ponte, les œufs de xénope sont récoltés et rincés avec du tampon HSB 1X (15 mM Hepes pH 7.6, 110 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.5 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaHCO₃), puis incubés dans un tampon HSB 0.3X, Cystéine 2% pendant 10 min afin de détacher la gangue gélatineuse des ovocytes. Les œufs sont rincés 5 fois avec le tampon HSB 1X, puis dans le tampon MMR 0.2X (MMR 1X : 5 mM HEPES pH 7.8, 0.1 M NaCl, 2 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂). Les œufs sont alors activés pendant 5 min dans un tampon MMR 0.2X + 0.3 µg/ml calcium ionophore. Les œufs activés sont rincés une fois dans le tampon MMR 0.2X puis trois fois dans un tampon d'extraction XB (10 mM HEPES pH 7.7, 100 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 % Sucrose, 1mM DTT). Les œufs sont incubés 10 min à température ambiante, puis triés afin d'éliminer les œufs nécrotiques. Après deux lavages au XB froid, les œufs sont repris dans du XB additionné d'inhibiteurs de protéases (10 µg/mL leupeptine, aprotinine et pepstatine) et de 100 µg/mL cytochalasine B. Les œufs sont alors transférés dans des tubes à centrifugation puis sédimentés pendant 10 min sur glace. L'excès de tampon est éliminé et les œufs sont éclatés par centrifugation à 10000rpm, 10min à 4°C. La phase protéique (intermédiaire) est alors prélevée et mélangée avec 10µg/mL inhibiteurs de

protéases, 10 µg/mL cytochalasine B, Energy Mix 1X (10 µg/ml Créatine Kinase, 10 mM Créatine Phosphate, 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂) et 5% glycérol. Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 10000 rpm à 4°C, le surnageant est prélevé, mélangé à 200µg/ml cycloheximide, aliquoté et congelé dans l'azote liquide.

2) Cinétique de réplication

Les extraits protéiques d'œuf de xénope préparées comme décrit précédemment sont complémentés avec 250 µg/mL cycloheximide et un mélange énergétique (Energy Mix décrit ci-dessus). En cas d'utilisation de protéines recombinantes dans les expériences, celles-ci sont mélangées à l'extrait et incubées 5 min sur glace. L'ADN matrice provient de noyaux de spermatozoïdes de xénope (500 noyaux par µL d'extrait d'œufs de xénope). La cinétique de réplication est suivie par incorporation d'un nucléotide radiomarqué, 1 µL de [α^{32} P]dNTP (3000 Ci/mmol) étant ajouté pour une réaction de 50 µL. Des fractions aliquotes des réactions sont prélevées à différents temps, et la réplication est stoppée par addition de 0.1% SDS, 5 mM EDTA puis les protéines sont digérées par un traitement avec 1 µg protéinase K pendant 4 h à 37°C. Les ADN sont alors précipités sur des filtres de fibre de verre GF-C (whatman) dans un tampon acide trichloroacétique (TCA) 5%, PPI 2%, les filtres sont lavés au TCA 5%, à l'éthanol, puis séchés. La radioactivité incorporée est mesurée par scintillation et la proportion d'ADN répliqué est calculée.

3) Analyse de la taille des ADN répliqués par électrophorèse sur gel alcalin

L'ADN contenu dans les différentes fractions aliquotes est purifié par extraction phénol/chloroforme, puis mélangé au tampon de charge (10 mM EDTA; 0.03 % Bromo cresol green; 10% Glycerol; 30 mM NaOH). Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'agarose (30 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 0.8% Agarose) et soumis à une électrophorèse pendant la nuit à 4°C à 40V dans un tampon alcalin 30 mM NaOH, 2.5 mM EDTA. Le gel est ensuite séché sous aspiration et les ADN répliqués sont révélés par exposition au Phosphorimager (GE Healthcare).

4) Analyse des protéines associées à la chromatine

Les fractions aliquotes sont diluées 10 fois dans un tampon d'extraction XB (100 mM KCl; 0.1 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 10 mM HEPES pH 7.7; 50 mM sucrose) en présence d'inhibiteurs de protéases, puis centrifugés 5 min à 1500g à 4°C afin de sédimenter les noyaux. Le culot de noyaux est resuspendu dans le tampon XB + 0.1% NP-40 et incubé 5min sur glace. Les échantillons sont alors centrifugés 5 min à 6000g à 4°C pour séparer la chromatine du nucléoplasme, les deux fractions sont mélangées au tampon de Laemmli, puis les protéines sont séparées par SDS-PAGE et analysées par western-blot.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development* *15*, 2177-2196.
- Achanta, G., Pelicano, H., Feng, L., Plunkett, W., and Huang, P. (2001). Interaction of p53 and DNA-PK in response to nucleoside analogues: potential role as a sensor complex for DNA damage. *Cancer research* *61*, 8723-8729.
- Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M.F., Guerrette, S., Marsischky, G.T., Kolodner, R., and Fishel, R. (1996). hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 13629-13634.
- Adelfalk, C., Kontou, M., Hirsch-Kauffmann, M., and Schweiger, M. (2003). Physical and functional interaction of the Werner syndrome protein with poly-ADP ribosyl transferase. *FEBS letters* *554*, 55-58.
- Aguiar, R.C., Takeyama, K., He, C., Kreinbrink, K., and Shipp, M.A. (2005). B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity. *The Journal of biological chemistry* *280*, 33756-33765.
- Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S.P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* *124*, 301-313.
- Ame, J.C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Hoger, T., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1999). PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of biological chemistry* *274*, 17860-17868.
- Ame, J.C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* *26*, 882-893.
- Anachkova, B., Russev, G., and Poirier, G.G. (1989). DNA replication and poly(ADP-ribose)ylation of chromatin. *Cytobios* *58*, 19-28.
- Andressoo, J.O., Hoeijmakers, J.H., and Mitchell, J.R. (2006). Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* *5*, 2886-2888.
- Araki, H., Ropp, P.A., Johnson, A.L., Johnston, L.H., Morrison, A., and Sugino, A. (1992). DNA polymerase II, the probable homolog of mammalian DNA polymerase epsilon, replicates chromosomal DNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* *11*, 733-740.
- Arata, Y., Fujita, M., Ohtani, K., Kijima, S., and Kato, J.Y. (2000). Cdk2-dependent and -independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *The Journal of biological chemistry* *275*, 6337-6345.

Bibliographie

Arezi, B., Kirk, B.W., Copeland, W.C., and Kuchta, R.D. (1999). Interactions of DNA with human DNA primase monitored with photoactivatable cross-linking agents: implications for the role of the p58 subunit. *Biochemistry* 38, 12899-12907.

Arezi, B., and Kuchta, R.D. (2000). Eukaryotic DNA primase. *Trends in biochemical sciences* 25, 572-576.

Ariumi, Y., Masutani, M., Copeland, T.D., Mimori, T., Sugimura, T., Shimotohno, K., Ueda, K., Hatanaka, M., and Noda, M. (1999). Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro. *Oncogene* 18, 4616-4625.

Aspinwall, R., Rothwell, D.G., Roldan-Arjona, T., Anselmino, C., Ward, C.J., Cheadle, J.P., Sampson, J.R., Lindahl, T., Harris, P.C., and Hickson, I.D. (1997). Cloning and characterization of a functional human homolog of Escherichia coli endonuclease III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 109-114.

Au, W.W., Salama, S.A., and Sierra-Torres, C.H. (2003). Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environmental health perspectives* 111, 1843-1850.

Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *The Journal of biological chemistry* 279, 55117-55126.

Audebert, M., Salles, B., Weinfeld, M., and Calsou, P. (2006). Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. *Journal of molecular biology* 356, 257-265.

Augustin, A., Spenlehauer, C., Dumond, H., Menissier-De Murcia, J., Piel, M., Schmit, A.C., Apiou, F., Vonesch, J.L., Kock, M., Bornens, M., *et al.* (2003). PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *Journal of cell science* 116, 1551-1562.

Bachrati, C.Z., and Hickson, I.D. (2003). RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *The Biochemical journal* 374, 577-606.

Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.

Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., *et al.* (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science (New York, NY)* 281, 1674-1677.

Barrows, L.R., Holden, J.A., Anderson, M., and D'Arpa, P. (1998). The CHO XRCC1 mutant, EM9, deficient in DNA ligase III activity, exhibits hypersensitivity to camptothecin independent of DNA replication. *Mutation research* 408, 103-110.

Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS letters* 490, 117-122.

- Beamish, H.J., Jessberger, R., Riballo, E., Priestley, A., Blunt, T., Kysela, B., and Jeggo, P.A. (2000). The C-terminal conserved domain of DNA-PKcs, missing in the SCID mouse, is required for kinase activity. *Nucleic acids research* 28, 1506-1513.
- Bebenek, K., Tissier, A., Frank, E.G., McDonald, J.P., Prasad, R., Wilson, S.H., Woodgate, R., and Kunkel, T.A. (2001). 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase iota in vitro. *Science (New York, NY)* 291, 2156-2159.
- Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1999). Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutation research* 424, 51-58.
- Beernink, P.T., Hwang, M., Ramirez, M., Murphy, M.B., Doyle, S.A., and Thelen, M.P. (2005). Specificity of protein interactions mediated by BRCT domains of the XRCC1 DNA repair protein. *The Journal of biological chemistry* 280, 30206-30213.
- Bekker-Jensen, S., Fugger, K., Danielsen, J.R., Gromova, I., Sehested, M., Celis, J., Bartek, J., Lukas, J., and Mailand, N. (2007). Human xip1 (c2orf13) is a novel regulator of cellular responses to DNA strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 282, 19638-19643.
- Bell, D.W., Varley, J.M., Szydlo, T.E., Kang, D.H., Wahrer, D.C., Shannon, K.E., Lubratovich, M., Verselis, S.J., Isselbacher, K.J., Fraumeni, J.F., *et al.* (1999). Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science (New York, NY)* 286, 2528-2531.
- Bell, S.P., and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry* 71, 333-374.
- Bell, S.P., and Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357, 128-134.
- Bienko, M., Green, C.M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., Kannouche, P., Wider, G., Peter, M., Lehmann, A.R., *et al.* (2005). Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science (New York, NY)* 310, 1821-1824.
- Blackwell, L.J., Bjornson, K.P., Allen, D.J., and Modrich, P. (2001). Distinct MutS DNA-binding modes that are differentially modulated by ATP binding and hydrolysis. *The Journal of biological chemistry* 276, 34339-34347.
- Blow, J.J. (2001). Control of chromosomal DNA replication in the early *Xenopus* embryo. *The EMBO journal* 20, 3293-3297.
- Boiteux, S., and Radicella, J.P. (1999). Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie* 81, 59-67.
- Boiteux, S., and Radicella, J.P. (2000). The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics* 377, 1-8.
- Borghesi, L., and Milcarek, C. (2006). From B cell to plasma cell: regulation of V(D)J recombination and antibody secretion. *Immunologic research* 36, 27-32.

Bibliographie

- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F., and Koonin, E.V. (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *Faseb J* *11*, 68-76.
- Bosotti, R., Isacchi, A., and Sonnhammer, E.L. (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends in biochemical sciences* *25*, 225-227.
- Botuyan, M.V., Nomine, Y., Yu, X., Juranic, N., Macura, S., Chen, J., and Mer, G. (2004). Structural basis of BACH1 phosphopeptide recognition by BRCA1 tandem BRCT domains. *Structure* *12*, 1137-1146.
- Boutros, R., Dozier, C., and Ducommun, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Current opinion in cell biology* *18*, 185-191.
- Braun, K.A., Lao, Y., He, Z., Ingles, C.J., and Wold, M.S. (1997). Role of protein-protein interactions in the function of replication protein A (RPA): RPA modulates the activity of DNA polymerase alpha by multiple mechanisms. *Biochemistry* *36*, 8443-8454.
- Brem, R., and Hall, J. (2005). XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic acids research* *33*, 2512-2520.
- Bresson, A., and Fuchs, R.P. (2002). Lesion bypass in yeast cells: Pol eta participates in a multi-DNA polymerase process. *The EMBO journal* *21*, 3881-3887.
- Brown, E.J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes & development* *14*, 397-402.
- Brugmans, L., Kanaar, R., and Essers, J. (2007). Analysis of DNA double-strand break repair pathways in mice. *Mutation research* *614*, 95-108.
- Brush, G.S., Anderson, C.W., and Kelly, T.J. (1994). The DNA-activated protein kinase is required for the phosphorylation of replication protein A during simian virus 40 DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 12520-12524.
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* *434*, 913-917.
- Burgers, P.M. (1998). Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair. *Chromosoma* *107*, 218-227.
- Burma, S., and Chen, D.J. (2004). Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA repair* *3*, 909-918.
- Burzio, L., and Koide, S.S. (1972). In vitro effect of NAD on DNA synthesis in isolated nuclei from regenerating rat liver and novikoff hepatoma. *FEBS letters* *20*, 29-32.
- Calabrese, C.R., Almassy, R., Barton, S., Batey, M.A., Calvert, A.H., Canan-Koch, S., Durkacz, B.W., Hostomsky, Z., Kumpf, R.A., Kyle, S., *et al.* (2004). Anticancer

- chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 56-67.
- Caldecott, K.W. (2004). DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA repair* 3, 875-882.
- Caldecott, K.W., McKeown, C.K., Tucker, J.D., Ljungquist, S., and Thompson, L.H. (1994). An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Molecular and cellular biology* 14, 68-76.
- Calsou, P., Delteil, C., Frit, P., Drouet, J., and Salles, B. (2003). Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment. *Journal of molecular biology* 326, 93-103.
- Campalans, A., Marsin, S., Nakabeppu, Y., O'Connor T, R., Boiteux, S., and Radicella, J.P. (2005). XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: a model for its recruitment to base excision repair. *DNA repair* 4, 826-835.
- Cannavo, E., Marra, G., Sabates-Bellver, J., Menigatti, M., Lipkin, S.M., Fischer, F., Cejka, P., and Jiricny, J. (2005). Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer research* 65, 10759-10766.
- Cantoni, O., Murray, D., and Meyn, R.E. (1987). Induction and repair of DNA single-strand breaks in EM9 mutant CHO cells treated with hydrogen peroxide. *Chemico-biological interactions* 63, 29-38.
- Cappelli, E., Taylor, R., Cevasco, M., Abbondandolo, A., Caldecott, K., and Frosina, G. (1997). Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *The Journal of biological chemistry* 272, 23970-23975.
- Carrano, A.V., Minkler, J.L., Dillehay, L.E., and Thompson, L.H. (1986). Incorporated bromodeoxyuridine enhances the sister-chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in an EMS-sensitive Chinese hamster cell line. *Mutation research* 162, 233-239.
- Cha, H., Wang, X., Li, H., and Fornace, A.J., Jr. (2007). A functional role for p38 MAPK in modulating mitotic transit in the absence of stress. *The Journal of biological chemistry* 282, 22984-22992.
- Champoux, J.J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry* 70, 369-413.
- Chappell, C., Hanakahi, L.A., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M., and West, S.C. (2002). Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *The EMBO journal* 21, 2827-2832.
- Chen, D.S., Herman, T., and Demple, B. (1991). Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA. *Nucleic acids research* 19, 5907-5914.

Bibliographie

- Chou, H.Y., Chou, H.T., and Lee, S.C. (2006). CDK-dependent activation of poly(ADP-ribose) polymerase member 10 (PARP10). *The Journal of biological chemistry* *281*, 15201-15207.
- Chow, J.P., Siu, W.Y., Fung, T.K., Chan, W.M., Lau, A., Arooz, T., Ng, C.P., Yamashita, K., and Poon, R.Y. (2003). DNA damage during the spindle-assembly checkpoint degrades CDC25A, inhibits cyclin-CDC2 complexes, and reverses cells to interphase. *Molecular biology of the cell* *14*, 3989-4002.
- Churchill, M.E., Peak, J.G., and Peak, M.J. (1991). Correlation between cell survival and DNA single-strand break repair proficiency in the Chinese hamster ovary cell lines AA8 and EM9 irradiated with 365-nm ultraviolet-A radiation. *Photochemistry and photobiology* *53*, 229-236.
- Cimprich, K.A., Shin, T.B., Keith, C.T., and Schreiber, S.L. (1996). cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 2850-2855.
- Coin, F., Proietti De Santis, L., Nardo, T., Zlobinskaya, O., Stefanini, M., and Egly, J.M. (2006). p8/TTD-A as a repair-specific TFIID subunit. *Molecular cell* *21*, 215-226.
- Convery, E., Shin, E.K., Ding, Q., Wang, W., Douglas, P., Davis, L.S., Nickoloff, J.A., Lees-Miller, S.P., and Meek, K. (2005). Inhibition of homologous recombination by variants of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 1345-1350.
- Copeland, W.C. (1997). Expression, purification, and characterization of the two human primase subunits and truncated complexes from *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* *9*, 1-9.
- Copeland, W.C., and Wang, T.S. (1993). Enzymatic characterization of the individual mammalian primase subunits reveals a biphasic mechanism for initiation of DNA replication. *The Journal of biological chemistry* *268*, 26179-26189.
- Costanzo, V., Shechter, D., Lupardus, P.J., Cimprich, K.A., Gottesman, M., and Gautier, J. (2003). An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Molecular cell* *11*, 203-213.
- Cui, X., Yu, Y., Gupta, S., Cho, Y.M., Lees-Miller, S.P., and Meek, K. (2005). Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Molecular and cellular biology* *25*, 10842-10852.
- Curtin, N.J. (2005). PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert reviews in molecular medicine* *7*, 1-20.
- D'Amours, D., and Jackson, S.P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nature reviews* *3*, 317-327.

- Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 39, 7559-7569.
- Dantzer, F., Giraud-Panis, M.J., Jaco, I., Ame, J.C., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C.E., Gilson, E., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., *et al.* (2004). Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Molecular and cellular biology* 24, 1595-1607.
- Dantzer, F., Mark, M., Quenet, D., Scherthan, H., Huber, A., Liebe, B., Monaco, L., Chicheportiche, A., Sassone-Corsi, P., de Murcia, G., *et al.* (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14854-14859.
- Dantzer, F., Nasheuer, H.P., Vonesch, J.L., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J. (1998). Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic acids research* 26, 1891-1898.
- de Boer, J., and Hoeijmakers, J.H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453-460.
- De Falco, M., Ferrari, E., De Felice, M., Rossi, M., Hubscher, U., and Pisani, F.M. (2007). The human GINS complex binds to and specifically stimulates human DNA polymerase alpha-primase. *EMBO reports* 8, 99-103.
- de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Ittel, M.E., Mandel, P., and Delain, E. (1983). Poly(ADP-ribose) polymerase auto-modification and interaction with DNA: electron microscopic visualization. *The EMBO journal* 2, 543-548.
- de Murcia, G., and Menissier de Murcia, J. (1994). Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends in biochemical sciences* 19, 172-176.
- de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., *et al.* (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7303-7307.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., and Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *The EMBO journal* 21, 3192-3200.
- Dhanalakshmi, S., Agarwal, C., Singh, R.P., and Agarwal, R. (2005). Silibinin up-regulates DNA-protein kinase-dependent p53 activation to enhance UVB-induced apoptosis in mouse epithelial JB6 cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 20375-20383.
- Dherin, C., Radicella, J.P., Dizdaroglu, M., and Boiteux, S. (1999). Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic acids research* 27, 4001-4007.

Bibliographie

- Dianov, G.L., and Parsons, J.L. (2007). Co-ordination of DNA single strand break repair. *DNA repair* 6, 454-460.
- Dianova, II, Sleeth, K.M., Allinson, S.L., Parsons, J.L., Breslin, C., Caldecott, K.W., and Dianov, G.L. (2004). XRCC1-DNA polymerase beta interaction is required for efficient base excision repair. *Nucleic acids research* 32, 2550-2555.
- DiGiuseppe, J.A., and Dresler, S.L. (1989). Bleomycin-induced DNA repair synthesis in permeable human fibroblasts: mediation of long-patch and short-patch repair by distinct DNA polymerases. *Biochemistry* 28, 9515-9520.
- Dillehay, L.E., Thompson, L.H., and Carrano, A.V. (1984). DNA-strand breaks associated with halogenated pyrimidine incorporation. *Mutation research* 131, 129-136.
- Dillehay, L.E., Thompson, L.H., Minkler, J.L., and Carrano, A.V. (1983). The relationship between sister-chromatid exchange and perturbations in DNA replication in mutant EM9 and normal CHO cells. *Mutation research* 109, 283-296.
- Ding, Q., Reddy, Y.V., Wang, W., Woods, T., Douglas, P., Ramsden, D.A., Lees-Miller, S.P., and Meek, K. (2003). Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* 23, 5836-5848.
- DiTullio, R.A., Jr., Mochan, T.A., Venere, M., Bartkova, J., Sehested, M., Bartek, J., and Halazonetis, T.D. (2002). 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nature cell biology* 4, 998-1002.
- Dominguez, I., Daza, P., Natarajan, A.T., and Cortes, F. (1998). A high yield of translocations parallels the high yield of sister chromatid exchanges in the CHO mutant EM9. *Mutation research* 398, 67-73.
- Dornreiter, I., Erdile, L.F., Gilbert, I.U., von Winkler, D., Kelly, T.J., and Fanning, E. (1992). Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *The EMBO journal* 11, 769-776.
- Durocher, D., and Jackson, S.P. (2002). The FHA domain. *FEBS letters* 513, 58-66.
- Edelmann, W., Umar, A., Yang, K., Heyer, J., Kucherlapati, M., Lia, M., Kneitz, B., Avdievich, E., Fan, K., Wong, E., *et al.* (2000). The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer research* 60, 803-807.
- Efeyan, A., and Serrano, M. (2007). p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 6, 1006-1010.
- Eki, T. (1994). Poly (ADP-ribose) polymerase inhibits DNA replication by human replicative DNA polymerase alpha, delta and epsilon in vitro. *FEBS letters* 356, 261-266.
- El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., and Caldecott, K.W. (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic acids research* 31, 5526-5533.

- El-Khamisy, S.F., Saifi, G.M., Weinfeld, M., Johansson, F., Helleday, T., Lupski, J.R., and Caldecott, K.W. (2005). Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature* 434, 108-113.
- Emmert, S., Kobayashi, N., Khan, S.G., and Kraemer, K.H. (2000). The xeroderma pigmentosum group C gene leads to selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers rather than 6-4 photoproducts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2151-2156.
- Emmert, S., Leibel, D., and Runger, T.M. (2006). Syndromes with genetic instability: model diseases for (skin) cancerogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges* 4, 721-731.
- Emmert, S., Schneider, T.D., Khan, S.G., and Kraemer, K.H. (2001). The human XPG gene: gene architecture, alternative splicing and single nucleotide polymorphisms. *Nucleic acids research* 29, 1443-1452.
- Emmert, S., Slor, H., Busch, D.B., Batko, S., Albert, R.B., Coleman, D., Khan, S.G., Abu-Libdeh, B., DiGiovanna, J.J., Cunningham, B.B., *et al.* (2002). Relationship of neurologic degeneration to genotype in three xeroderma pigmentosum group G patients. *The Journal of investigative dermatology* 118, 972-982.
- Espejel, S., Martin, M., Klatt, P., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2004). Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice. *EMBO reports* 5, 503-509.
- Falck, J., Petrini, J.H., Williams, B.R., Lukas, J., and Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nature genetics* 30, 290-294.
- Fan, J., Otterlei, M., Wong, H.K., Tomkinson, A.E., and Wilson, D.M., 3rd (2004). XRCC1 co-localizes and physically interacts with PCNA. *Nucleic acids research* 32, 2193-2201.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., *et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917-921.
- Ferro, A.M., and Olivera, B.M. (1982). Poly(ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism. *The Journal of biological chemistry* 257, 7808-7813.
- Fiscella, M., Ullrich, S.J., Zambrano, N., Shields, M.T., Lin, D., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W., Mercer, W.E., and Appella, E. (1993). Mutation of the serine 15 phosphorylation site of human p53 reduces the ability of p53 to inhibit cell cycle progression. *Oncogene* 8, 1519-1528.
- Fisher, A.E., Hochegeger, H., Takeda, S., and Caldecott, K.W. (2007). Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Accelerates Single-Strand Break Repair in Concert with Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. *Molecular and cellular biology* 27, 5597-5605.

Bibliographie

- Foiani, M., Lucchini, G., and Plevani, P. (1997). The DNA polymerase alpha-primase complex couples DNA replication, cell-cycle progression and DNA-damage response. *Trends in biochemical sciences* 22, 424-427.
- Fortini, P., and Dogliotti, E. (2007). Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA repair* 6, 398-409.
- Fortini, P., Pascucci, B., Belisario, F., and Dogliotti, E. (2000). DNA polymerase beta is required for efficient DNA strand break repair induced by methyl methanesulfonate but not by hydrogen peroxide. *Nucleic acids research* 28, 3040-3046.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R.W., Wilson, S.H., and Dogliotti, E. (1998). Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* 37, 3575-3580.
- Frouin, I., Maga, G., Denegri, M., Riva, F., Savio, M., Spadari, S., Prosperi, E., and Scovassi, A.I. (2003). Human proliferating cell nuclear antigen, poly(ADP-ribose) polymerase-1, and p21waf1/cip1. A dynamic exchange of partners. *The Journal of biological chemistry* 278, 39265-39268.
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayashi, Y., and Ishibashi, M. (1997). In vivo interaction of human MCM heterohexameric complexes with chromatin. Possible involvement of ATP. *The Journal of biological chemistry* 272, 10928-10935.
- Gao, G., Guo, X., and Goff, S.P. (2002). Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein. *Science (New York, NY)* 297, 1703-1706.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Sabariego, R., Dominguez, O., Rodriguez, J., Kirchhoff, T., Garcia-Palomero, E., Picher, A.J., Juarez, R., Ruiz, J.F., *et al.* (2002). DNA polymerase lambda, a novel DNA repair enzyme in human cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 13184-13191.
- Garg, P., and Burgers, P.M. (2005a). DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 40, 115-128.
- Garg, P., and Burgers, P.M. (2005b). Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases eta and REV1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18361-18366.
- Garg, P., Stith, C.M., Sabouri, N., Johansson, E., and Burgers, P.M. (2004). Idling by DNA polymerase delta maintains a ligatable nick during lagging-strand DNA replication. *Genes & development* 18, 2764-2773.
- Gerard, M., Fischer, L., Moncollin, V., Chipoulet, J.M., Chambon, P., and Egly, J.M. (1991). Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *The Journal of biological chemistry* 266, 20940-20945.
- Gibbs, P.E., McDonald, J., Woodgate, R., and Lawrence, C.W. (2005). The relative roles in vivo of *Saccharomyces cerevisiae* Pol eta, Pol zeta, Rev1 protein and Pol32 in the bypass and

- mutation induction of an abasic site, T-T (6-4) photoadduct and T-T cis-syn cyclobutane dimer. *Genetics* *169*, 575-582.
- Glover, J.N., Williams, R.S., and Lee, M.S. (2004). Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. *Trends in biochemical sciences* *29*, 579-585.
- Goenka, S., and Boothby, M. (2006). Selective potentiation of Stat-dependent gene expression by collaborator of Stat6 (CoaSt6), a transcriptional cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 4210-4215.
- Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J., and Jackson, S.P. (2003). MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* *421*, 952-956.
- Goodarzi, A.A., Jonnalagadda, J.C., Douglas, P., Young, D., Ye, R., Moorhead, G.B., Lees-Miller, S.P., and Khanna, K.K. (2004). Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *The EMBO journal* *23*, 4451-4461.
- Goode, E.L., Ulrich, C.M., and Potter, J.D. (2002). Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *11*, 1513-1530.
- Gueven, N., Becherel, O.J., Kijas, A.W., Chen, P., Howe, O., Rudolph, J.H., Gatti, R., Date, H., Onodera, O., Taucher-Scholz, G., *et al.* (2004). Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. *Human molecular genetics* *13*, 1081-1093.
- Guo, X., Carroll, J.W., Macdonald, M.R., Goff, S.P., and Gao, G. (2004). The zinc finger antiviral protein directly binds to specific viral mRNAs through the CCCH zinc finger motifs. *Journal of virology* *78*, 12781-12787.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X., and Dunphy, W.G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes & development* *14*, 2745-2756.
- Haber, J.E. (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* *16*, 259-264.
- Hadshiew, I.M., Eller, M.S., Moll, I., and Gilchrest, B.A. (2002). [Photoprotective mechanisms of human skin. Modulation by oligonucleotides]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* *53*, 167-173.
- Hanai, S., Kanai, M., Ohashi, S., Okamoto, K., Yamada, M., Takahashi, H., and Miwa, M. (2004). Loss of poly(ADP-ribose) glycohydrolase causes progressive neurodegeneration in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 82-86.
- Haracska, L., Johnson, R.E., Unk, I., Phillips, B., Hurwitz, J., Prakash, L., and Prakash, S. (2001). Physical and functional interactions of human DNA polymerase eta with PCNA. *Molecular and cellular biology* *21*, 7199-7206.

Bibliographie

- Haracska, L., Prakash, L., and Prakash, S. (2002). Role of human DNA polymerase kappa as an extender in translesion synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16000-16005.
- Hartley, K.O., Gell, D., Smith, G.C., Zhang, H., Divecha, N., Connelly, M.A., Admon, A., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W., and Jackson, S.P. (1995). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell* 82, 849-856.
- Hassa, P.O., Buerki, C., Lombardi, C., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2003). Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *The Journal of biological chemistry* 278, 45145-45153.
- Hazra, T.K., Izumi, T., Boldogh, I., Imhoff, B., Kow, Y.W., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., and Mitra, S. (2002). Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3523-3528.
- Hazra, T.K., and Mitra, S. (2006). Purification and characterization of NEIL1 and NEIL2, members of a distinct family of mammalian DNA glycosylases for repair of oxidized bases. *Methods in enzymology* 408, 33-48.
- Heffernan, T.P., Simpson, D.A., Frank, A.R., Heinloth, A.N., Paules, R.S., Cordeiro-Stone, M., and Kaufmann, W.K. (2002). An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. *Molecular and cellular biology* 22, 8552-8561.
- Helleday, T., Lo, J., van Gent, D.C., and Engelward, B.P. (2007). DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA repair*.
- Hermeking, H., and Benzinger, A. (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Seminars in cancer biology* 16, 183-192.
- Hickson, I.D. (2003). RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat Rev Cancer* 3, 169-178.
- Hirano, M., Yamamoto, A., Mori, T., Lan, L., Iwamoto, T.A., Aoki, M., Shimada, K., Furiya, Y., Kariya, S., Asai, H., *et al.* (2007). DNA single-strand break repair is impaired in aprataxin-related ataxia. *Annals of neurology* 61, 162-174.
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science (New York, NY)* 253, 49-53.

- Hong, S.J., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2004). Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends in pharmacological sciences* 25, 259-264.
- Hu, Z., Ma, H., Chen, F., Wei, Q., and Shen, H. (2005). XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1810-1818.
- Huang, J., and Dynan, W.S. (2002). Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic acids research* 30, 667-674.
- Hung, R.J., Brennan, P., Canzian, F., Szeszenia-Dabrowska, N., Zaridze, D., Lissowska, J., Rudnai, P., Fabianova, E., Mates, D., Foretova, L., *et al.* (2005a). Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 567-576.
- Hung, R.J., Hall, J., Brennan, P., and Boffetta, P. (2005b). Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *American journal of epidemiology* 162, 925-942.
- Iftner, T., Elbel, M., Schopp, B., Hiller, T., Loizou, J.I., Caldecott, K.W., and Stubenrauch, F. (2002). Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *The EMBO journal* 21, 4741-4748.
- Ikejima, M., Noguchi, S., Yamashita, R., Ogura, T., Sugimura, T., Gill, D.M., and Miwa, M. (1990). The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. Other structures recognize intact DNA. *The Journal of biological chemistry* 265, 21907-21913.
- Ireson, C.R., and Kelland, L.R. (2006). Discovery and development of anticancer aptamers. *Molecular cancer therapeutics* 5, 2957-2962.
- Ishimi, Y. (1997). A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *The Journal of biological chemistry* 272, 24508-24513.
- Iyer, R.R., Pluciennik, A., Burdett, V., and Modrich, P.L. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* 106, 302-323.
- Izumi, T., Hazra, T.K., Boldogh, I., Tomkinson, A.E., Park, M.S., Ikeda, S., and Mitra, S. (2000). Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species. *Carcinogenesis* 21, 1329-1334.
- Jackson, A.L., Pahl, P.M., Harrison, K., Rosamond, J., and Sclafani, R.A. (1993). Cell cycle regulation of the yeast Cdc7 protein kinase by association with the Dbf4 protein. *Molecular and cellular biology* 13, 2899-2908.
- Jackson, S.P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23, 687-696.

Bibliographie

- Jang, S.W., Elsasser, S., Campbell, J.L., and Kim, J. (2001). Identification of Cdc6 protein domains involved in interaction with Mcm2 protein and Cdc4 protein in budding yeast cells. *The Biochemical journal* 354, 655-661.
- Jeggo, P.A., Hafezparast, M., Thompson, A.F., Broughton, B.C., Kaur, G.P., Zdzienicka, M.Z., and Athwal, R.S. (1992). Localization of a DNA repair gene (XRCC5) involved in double-strand-break rejoining to human chromosome 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6423-6427.
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews* 7, 335-346.
- Johnson, A., and O'Donnell, M. (2005). Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annual review of biochemistry* 74, 283-315.
- Johnson, R.D., and Jasin, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *The EMBO journal* 19, 3398-3407.
- Johnson, R.E., Kovvali, G.K., Prakash, L., and Prakash, S. (1998). Role of yeast Rth1 nuclease and its homologs in mutation avoidance, DNA repair, and DNA replication. *Current genetics* 34, 21-29.
- Joo, W.S., Jeffrey, P.D., Cantor, S.B., Finnin, M.S., Livingston, D.M., and Pavletich, N.P. (2002). Structure of the 53BP1 BRCT region bound to p53 and its comparison to the Brcal BRCT structure. *Genes & development* 16, 583-593.
- Jun, S.H., Kim, T.G., and Ban, C. (2006). DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *The FEBS journal* 273, 1609-1619.
- Kadyrov, F.A., Dzantiev, L., Constantin, N., and Modrich, P. (2006). Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* 126, 297-308.
- Kannouche, P.L., Wing, J., and Lehmann, A.R. (2004). Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Molecular cell* 14, 491-500.
- Karimi-Busheri, F., Daly, G., Robins, P., Canas, B., Pappin, D.J., Sgouros, J., Miller, G.G., Fakhrai, H., Davis, E.M., Le Beau, M.M., *et al.* (1999). Molecular characterization of a human DNA kinase. *The Journal of biological chemistry* 274, 24187-24194.
- Karmakar, P., Piotrowski, J., Brosh, R.M., Jr., Sommers, J.A., Miller, S.P., Cheng, W.H., Snowden, C.M., Ramsden, D.A., and Bohr, V.A. (2002). Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase in vivo and in vitro, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 277, 18291-18302.
- Karras, G.I., Kustatscher, G., Buhecha, H.R., Allen, M.D., Pugieux, C., Sait, F., Bycroft, M., and Ladurner, A.G. (2005). The macro domain is an ADP-ribose binding module. *The EMBO journal* 24, 1911-1920.

- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., and Poirier, G.G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer research* 53, 3976-3985.
- Keeney, S., Chang, G.J., and Linn, S. (1993). Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E. *The Journal of biological chemistry* 268, 21293-21300.
- Keil, C., Grobe, T., and Oei, S.L. (2006). MNNG-induced cell death is controlled by interactions between PARP-1, poly(ADP-ribose) glycohydrolase, and XRCC1. *The Journal of biological chemistry* 281, 34394-34405.
- Khan, S.G., Oh, K.S., Shahlavi, T., Ueda, T., Busch, D.B., Inui, H., Emmert, S., Imoto, K., Muniz-Medina, V., Baker, C.C., *et al.* (2006). Reduced XPC DNA repair gene mRNA levels in clinically normal parents of xeroderma pigmentosum patients. *Carcinogenesis* 27, 84-94.
- Kickhoefer, V.A., Siva, A.C., Kedersha, N.L., Inman, E.M., Ruland, C., Streuli, M., and Rome, L.H. (1999). The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of cell biology* 146, 917-928.
- Kim, K., Biade, S., and Matsumoto, Y. (1998). Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. *The Journal of biological chemistry* 273, 8842-8848.
- Kim, M.Y., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J.T., and Kraus, W.L. (2004). NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* 119, 803-814.
- Kim, S.T., Xu, B., and Kastan, M.B. (2002). Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes & development* 16, 560-570.
- Kirk, B.W., and Kuchta, R.D. (1999). Arg304 of human DNA primase is a key contributor to catalysis and NTP binding: primase and the family X polymerases share significant sequence homology. *Biochemistry* 38, 7727-7736.
- Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R.W., Smithson, W.A., Lindor, N.M., and Furuichi, Y. (1999). Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nature genetics* 22, 82-84.
- Klungland, A., Hoss, M., Gunz, D., Constantinou, A., Clarkson, S.G., Doetsch, P.W., Bolton, P.H., Wood, R.D., and Lindahl, T. (1999). Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Molecular cell* 3, 33-42.
- Klungland, A., and Lindahl, T. (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *The EMBO journal* 16, 3341-3348.
- Ko, M.J., Murata, K., Hwang, D.S., and Parvin, J.D. (2006). Inhibition of BRCA1 in breast cell lines causes the centrosome duplication cycle to be disconnected from the cell cycle. *Oncogene* 25, 298-303.

Bibliographie

- Koh, D.W., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2005a). Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res* 52, 5-14.
- Koh, D.W., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2005b). Poly(ADP-ribosyl)ation regulation of life and death in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 62, 760-768.
- Koh, D.W., Lawler, A.M., Poitras, M.F., Sasaki, M., Wattler, S., Nehls, M.C., Stoger, T., Poirier, G.G., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2004). Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17699-17704.
- Koonin, E.V., Altschul, S.F., and Bork, P. (1996). BRCA1 protein products ... Functional motifs. *Nature genetics* 13, 266-268.
- Kraemer, K.H., Lee, M.M., and Scotto, J. (1987). Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Archives of dermatology* 123, 241-250.
- Kramer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Bartek, J., and Lukas, J. (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nature cell biology* 6, 884-891.
- Kraus, W.L., and Lis, J.T. (2003). PARP goes transcription. *Cell* 113, 677-683.
- Kreditor, M., Fink, M., and Hochster, H.S. (2005). Recent developments in the clinical activity of topoisomerase-1 inhibitors. *Cancer chemotherapy and biological response modifiers* 22, 61-100.
- Kubota, Y., and Horiuchi, S. (2003). Independent roles of XRCC1's two BRCT motifs in recovery from methylation damage. *DNA repair* 2, 407-415.
- Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D.E., and Lindahl, T. (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *The EMBO journal* 15, 6662-6670.
- Kukimoto, I., Igaki, H., and Kanda, T. (1999). Human CDC45 protein binds to minichromosome maintenance 7 protein and the p70 subunit of DNA polymerase alpha. *European journal of biochemistry / FEBS* 265, 936-943.
- Kulaksiz, G., Reardon, J.T., and Sancar, A. (2005). Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties. *Molecular and cellular biology* 25, 9784-9792.
- Kuzminov, A. (2001a). DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8461-8468.

- Kuzminov, A. (2001b). Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8241-8246.
- Kysela, B., Chovanec, M., and Jeggo, P.A. (2005). Phosphorylation of linker histones by DNA-dependent protein kinase is required for DNA ligase IV-dependent ligation in the presence of histone H1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1877-1882.
- Ladiges, W., Wiley, J., and MacAuley, A. (2003). Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and age-related disease. *Mechanisms of ageing and development* 124, 27-32.
- Ladiges, W.C. (2006). Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. *Oncogene* 25, 1612-1619.
- Ladurner, A.G. (2003). Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription. *Molecular cell* 12, 1-3.
- Laine, J.P., and Egly, J.M. (2006). When transcription and repair meet: a complex system. *Trends Genet* 22, 430-436.
- Lamerdin, J.E., Montgomery, M.A., Stilwagen, S.A., Scheidecker, L.K., Tebbs, R.S., Brookman, K.W., Thompson, L.H., and Carrano, A.V. (1995). Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. *Genomics* 25, 547-554.
- Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., Wilson, S.H., and Yasui, A. (2004). In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13738-13743.
- Le Cam, E., Fack, F., Menissier-de Murcia, J., Cognet, J.A., Barbin, A., Sarantoglou, V., Revet, B., Delain, E., and de Murcia, G. (1994). Conformational analysis of a 139 base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase. *Journal of molecular biology* 235, 1062-1071.
- Lebel, M., Lavoie, J., Gaudreault, I., Bronsard, M., and Drouin, R. (2003). Genetic cooperation between the Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in preventing chromatid breaks, complex chromosomal rearrangements, and cancer in mice. *The American journal of pathology* 162, 1559-1569.
- Lee, J.B., Hite, R.K., Hamdan, S.M., Xie, X.S., Richardson, C.C., and van Oijen, A.M. (2006). DNA primase acts as a molecular brake in DNA replication. *Nature* 439, 621-624.
- Lee, J.H., and Paull, T.T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science (New York, NY)* 304, 93-96.
- Lee, J.S., Collins, K.M., Brown, A.L., Lee, C.H., and Chung, J.H. (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 404, 201-204.

Bibliographie

Lee, S.H., and Kim, C.H. (2002). DNA-dependent protein kinase complex: a multifunctional protein in DNA repair and damage checkpoint. *Molecules and cells* *13*, 159-166.

Lees-Miller, S.P., Sakaguchi, K., Ullrich, S.J., Appella, E., and Anderson, C.W. (1992). Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Molecular and cellular biology* *12*, 5041-5049.

Lehmann, A.R. (1974). Postreplication repair of DNA in mammalian cells. *Life sciences* *15*, 2005-2016.

Lehmann, A.R. (2006). Translesion synthesis in mammalian cells. *Experimental cell research* *312*, 2673-2676.

Lehmann, A.R., and Norris, P.G. (1989). DNA repair and cancer: speculations based on studies with xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome and trichothiodystrophy. *Carcinogenesis* *10*, 1353-1356.

Leibeling, D., Laspe, P., and Emmert, S. (2006). Nucleotide excision repair and cancer. *Journal of molecular histology* *37*, 225-238.

Lemaire, M., Froment, C., Boutros, R., Mondesert, O., Nebreda, A.R., Monsarrat, B., and Ducommun, B. (2006). CDC25B phosphorylation by p38 and MK-2. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* *5*, 1649-1653.

Levin, D.S., McKenna, A.E., Motycka, T.A., Matsumoto, Y., and Tomkinson, A.E. (2000). Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. *Curr Biol* *10*, 919-922.

Levy, N., Martz, A., Bresson, A., Spenlehauer, C., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J. (2006). XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage. *Nucleic acids research* *34*, 32-41.

Licht, C.L., Stevnsner, T., and Bohr, V.A. (2003). Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. *American journal of human genetics* *73*, 1217-1239.

Lieber, M.R., Yu, K., and Raghavan, S.C. (2006). Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA repair* *5*, 1234-1245.

Lim, D.S., Kim, S.T., Xu, B., Maser, R.S., Lin, J., Petrini, J.H., and Kastan, M.B. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* *404*, 613-617.

Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes & development* *15*, 1833-1844.

Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* *362*, 709-715.

- Lindahl, T., Rydberg, B., Hjelmgren, T., Olsson, M., and Jacobsson, A. (1982). Cellular defense mechanisms against alkylation of DNA. *Basic life sciences* 20, 89-102.
- Linke, S.P., Sengupta, S., Khabie, N., Jeffries, B.A., Buchhop, S., Miska, S., Henning, W., Pedoux, R., Wang, X.W., Hofseth, L.J., *et al.* (2003). p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer research* 63, 2596-2605.
- Litchfield, D.W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *The Biochemical journal* 369, 1-15.
- Liu, Y., Beard, W.A., Shock, D.D., Prasad, R., Hou, E.W., and Wilson, S.H. (2005). DNA polymerase beta and flap endonuclease 1 enzymatic specificities sustain DNA synthesis for long patch base excision repair. *The Journal of biological chemistry* 280, 3665-3674.
- Liu, Y., Snow, B.E., Kickhoefer, V.A., Erdmann, N., Zhou, W., Wakeham, A., Gomez, M., Rome, L.H., and Harrington, L. (2004). Vault poly(ADP-ribose) polymerase is associated with mammalian telomerase and is dispensable for telomerase function and vault structure in vivo. *Molecular and cellular biology* 24, 5314-5323.
- Lock, R.B., and Ross, W.E. (1987). DNA topoisomerases in cancer therapy. *Anti-cancer drug design* 2, 151-164.
- Loizou, J.I., El-Khamisy, S.F., Zlatanou, A., Moore, D.J., Chan, D.W., Qin, J., Sarno, S., Meggio, F., Pinna, L.A., and Caldecott, K.W. (2004). The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell* 117, 17-28.
- Lonskaya, I., Potaman, V.N., Shlyakhtenko, L.S., Oussatcheva, E.A., Lyubchenko, Y.L., and Soldatenkov, V.A. (2005). Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *The Journal of biological chemistry* 280, 17076-17083.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., *et al.* (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Molecular cell* 21, 187-200.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Wu, X., and Chen, J. (2003). MDC1 is coupled to activated CHK2 in mammalian DNA damage response pathways. *Nature* 421, 957-961.
- Lunn, R.M., Langlois, R.G., Hsieh, L.L., Thompson, C.L., and Bell, D.A. (1999). XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer research* 59, 2557-2561.
- Luo, H., Chan, D.W., Yang, T., Rodriguez, M., Chen, B.P., Leng, M., Mu, J.J., Chen, D., Songyang, Z., Wang, Y., *et al.* (2004). A new XRCC1-containing complex and its role in cellular survival of methyl methanesulfonate treatment. *Molecular and cellular biology* 24, 8356-8365.
- Lutzmann, M., Maiorano, D., and Mechali, M. (2006). A Cdt1-geminin complex licenses chromatin for DNA replication and prevents rereplication during S phase in *Xenopus*. *The EMBO journal* 25, 5764-5774.

Bibliographie

- Lynn, A., Ashley, T., and Hassold, T. (2004). Variation in human meiotic recombination. *Annual review of genomics and human genetics* 5, 317-349.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781-794.
- Mackey, Z.B., Niedergang, C., Murcia, J.M., Leppard, J., Au, K., Chen, J., de Murcia, G., and Tomkinson, A.E. (1999). DNA ligase III is recruited to DNA strand breaks by a zinc finger motif homologous to that of poly(ADP-ribose) polymerase. Identification of two functionally distinct DNA binding regions within DNA ligase III. *The Journal of biological chemistry* 274, 21679-21687.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science (New York, NY)* 288, 1425-1429.
- Maiorano, D., Lutzmann, M., and Mechali, M. (2006). MCM proteins and DNA replication. *Current opinion in cell biology* 18, 130-136.
- Mallery, D.L., Tanganelli, B., Colella, S., Steingrimsdottir, H., van Gool, A.J., Troelstra, C., Stefanini, M., and Lehmann, A.R. (1998). Molecular analysis of mutations in the CSB (ERCC6) gene in patients with Cockayne syndrome. *American journal of human genetics* 62, 77-85.
- Mani, R.S., Karimi-Busheri, F., Fanta, M., Caldecott, K.W., Cass, C.E., and Weinfeld, M. (2004). Biophysical characterization of human XRCC1 and its binding to damaged and undamaged DNA. *Biochemistry* 43, 16505-16514.
- Marini, F., Pelliccioli, A., Paciotti, V., Lucchini, G., Plevani, P., Stern, D.F., and Foiani, M. (1997). A role for DNA primase in coupling DNA replication to DNA damage response. *The EMBO journal* 16, 639-650.
- Marsin, S., Vidal, A.E., Sossou, M., Menissier-de Murcia, J., Le Page, F., Boiteux, S., de Murcia, G., and Radicella, J.P. (2003). Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *The Journal of biological chemistry* 278, 44068-44074.
- Martincic, D., and Hande, K.R. (2005). Topoisomerase II inhibitors. *Cancer chemotherapy and biological response modifiers* 22, 101-121.
- Maruta, H., Okita, N., Takasawa, R., Uchiumi, F., Hatano, T., and Tanuma, S. (2007). The involvement of ATP produced via (ADP-Ribose)_n in the maintenance of DNA replication apparatus during DNA repair. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30, 447-450.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Molecular and cellular biology* 18, 3563-3571.

- Masuda, T., Mimura, S., and Takisawa, H. (2003). CDK- and Cdc45-dependent priming of the MCM complex on chromatin during S-phase in *Xenopus* egg extracts: possible activation of MCM helicase by association with Cdc45. *Genes Cells* 8, 145-161.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2000). Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase η . *The EMBO journal* 19, 3100-3109.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., and Hanaoka, F. (1999a). The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature* 399, 700-704.
- Masutani, M., Nozaki, T., Nishiyama, E., Shimokawa, T., Tachi, Y., Suzuki, H., Nakagama, H., Wakabayashi, K., and Sugimura, T. (1999b). Function of poly(ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice. *Molecular and cellular biochemistry* 193, 149-152.
- Matsumoto, Y., and Kim, K. (1995). Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase β during DNA repair. *Science (New York, NY)* 269, 699-702.
- Matsumoto, Y., Kim, K., Hurwitz, J., Gary, R., Levin, D.S., Tomkinson, A.E., and Park, M.S. (1999). Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. *The Journal of biological chemistry* 274, 33703-33708.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., *et al.* (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes & development* 15, 1067-1077.
- McCulloch, S.D., Kokoska, R.J., Masutani, C., Iwai, S., Hanaoka, F., and Kunkel, T.A. (2004). Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase η occurs with biased fidelity. *Nature* 428, 97-100.
- McGowan, C.H. (2002). Checking in on Cds1 (Chk2): A checkpoint kinase and tumor suppressor. *Bioessays* 24, 502-511.
- Meder, V.S., Boeglin, M., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2005). PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli. *Journal of cell science* 118, 211-222.
- Meek, K., Douglas, P., Cui, X., Ding, Q., and Lees-Miller, S.P. (2007). trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining. *Molecular and cellular biology* 27, 3881-3890.
- Mendoza-Alvarez, H., and Alvarez-Gonzalez, R. (1993). Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular. *The Journal of biological chemistry* 268, 22575-22580.
- Menissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Ame, J.C., Dierich, A., LeMeur, M., *et al.* (2003). Functional interaction

between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *The EMBO journal* 22, 2255-2263.

Merkle, D., Douglas, P., Moorhead, G.B., Leonenko, Z., Yu, Y., Cramb, D., Bazett-Jones, D.P., and Lees-Miller, S.P. (2002). The DNA-dependent protein kinase interacts with DNA to form a protein-DNA complex that is disrupted by phosphorylation. *Biochemistry* 41, 12706-12714.

Meyer-Ficca, M.L., Meyer, R.G., Coyle, D.L., Jacobson, E.L., and Jacobson, M.K. (2004). Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Experimental cell research* 297, 521-532.

Mi, J., Zhang, X., Rabbani, Z.N., Liu, Y., Reddy, S.K., Su, Z., Salahuddin, F.K., Viles, K., Giangrande, P.H., Dewhirst, M.W., *et al.* (2007). RNA Aptamer-targeted Inhibition of NF-kappaB Suppresses Non-small Cell Lung Cancer Resistance to Doxorubicin. *Mol Ther.*

Michael, D., and Oren, M. (2002). The p53 and Mdm2 families in cancer. *Current opinion in genetics & development* 12, 53-59.

Michael, W.M., Ott, R., Fanning, E., and Newport, J. (2000). Activation of the DNA replication checkpoint through RNA synthesis by primase. *Science (New York, NY)* 289, 2133-2137.

Miller, M.R., and Chinault, D.N. (1982). The roles of DNA polymerases alpha, beta, and gamma in DNA repair synthesis induced in hamster and human cells by different DNA damaging agents. *The Journal of biological chemistry* 257, 10204-10209.

Mizuno, T., Ito, N., Yokoi, M., Kobayashi, A., Tamai, K., Miyazawa, H., and Hanaoka, F. (1998). The second-largest subunit of the mouse DNA polymerase alpha-primase complex facilitates both production and nuclear translocation of the catalytic subunit of DNA polymerase alpha. *Molecular and cellular biology* 18, 3552-3562.

Mizuno, T., Okamoto, T., Yokoi, M., Izumi, M., Kobayashi, A., Hachiya, T., Tamai, K., Inoue, T., and Hanaoka, F. (1996). Identification of the nuclear localization signal of mouse DNA primase: nuclear transport of p46 subunit is facilitated by interaction with p54 subunit. *Journal of cell science* 109 (Pt 11), 2627-2636.

Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F., and Kroemer, G. (2006). Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends in cell biology* 16, 264-272.

Mohrenweiser, H.W., Carrano, A.V., Fertitta, A., Perry, B., Thompson, L.H., Tucker, J.D., and Weber, C.A. (1989). Refined mapping of the three DNA repair genes, ERCC1, ERCC2, and XRCC1, on human chromosome 19. *Cytogenetics and cell genetics* 52, 11-14.

Moore, D.J., Taylor, R.M., Clements, P., and Caldecott, K.W. (2000). Mutation of a BRCT domain selectively disrupts DNA single-strand break repair in noncycling Chinese hamster ovary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13649-13654.

- Morrison, A., Araki, H., Clark, A.B., Hamatake, R.K., and Sugino, A. (1990). A third essential DNA polymerase in *S. cerevisiae*. *Cell* 62, 1143-1151.
- Moyer, S.E., Lewis, P.W., and Botchan, M.R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10236-10241.
- Muller, J.G., Duarte, V., Hickerson, R.P., and Burrows, C.J. (1998). Gel electrophoretic detection of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7, 8-dihydro-8-oxoadenine via oxidation by Ir (IV). *Nucleic acids research* 26, 2247-2249.
- Nash, R.A., Caldecott, K.W., Barnes, D.E., and Lindahl, T. (1997). XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry* 36, 5207-5211.
- Nelms, B.E., Maser, R.S., MacKay, J.F., Lagally, M.G., and Petrini, J.H. (1998). In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science (New York, NY)* 280, 590-592.
- Nelson, J.R., Lawrence, C.W., and Hinkle, D.C. (1996). Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature* 382, 729-731.
- Nguewa, P.A., Fuertes, M.A., Cepeda, V., Alonso, C., Quevedo, C., Soto, M., and Perez, J.M. (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor 3-aminobenzamide enhances apoptosis induction by platinum complexes in cisplatin-resistant tumor cells. *Medicinal chemistry (Sharjah, United Arab Emirates)* 2, 47-53.
- Nocentini, S. (1999). Rejoining kinetics of DNA single- and double-strand breaks in normal and DNA ligase-deficient cells after exposure to ultraviolet C and gamma radiation: an evaluation of ligating activities involved in different DNA repair processes. *Radiation research* 151, 423-432.
- Noel, G., Godon, C., Fernet, M., Giocanti, N., Megnin-Chanet, F., and Favaudon, V. (2006). Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis. *Molecular cancer therapeutics* 5, 564-574.
- Norbury, C.J., and Zivnotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 2797-2808.
- Ohmori, H., Friedberg, E.C., Fuchs, R.P., Goodman, M.F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C.W., Livneh, Z., Nohmi, T., *et al.* (2001). The Y-family of DNA polymerases. *Molecular cell* 8, 7-8.
- Okano, S., Lan, L., Caldecott, K.W., Mori, T., and Yasui, A. (2003). Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Molecular and cellular biology* 23, 3974-3981.
- Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., and Sugino, A. (1968). Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly

synthesized chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 59, 598-605.

Oliver, A.W., Ame, J.C., Roe, S.M., Good, V., de Murcia, G., and Pearl, L.H. (2004). Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Nucleic acids research* 32, 456-464.

Op het Veld, C.W., Jansen, J., Zdzienicka, M.Z., Vrieling, H., and van Zeeland, A.A. (1998). Methyl methanesulfonate-induced hprt mutation spectra in the Chinese hamster cell line CHO9 and its xrcc1-deficient derivative EM-C11. *Mutation research* 398, 83-92.

Op het Veld, C.W., Zdzienicka, M.Z., Vrieling, H., Lohman, P.H., and van Zeeland, A.A. (1994). Molecular analysis of ethyl methanesulfonate-induced mutations at the hprt gene in the ethyl methanesulfonate-sensitive Chinese hamster cell line EM-C11 and its parental line CHO9. *Cancer research* 54, 3001-3006.

Pacek, M., and Walter, J.C. (2004). A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *The EMBO journal* 23, 3667-3676.

Pages, V., and Fuchs, R.P. (2002). How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene* 21, 8957-8966.

Park, B.S., Song, Y.S., Yee, S.B., Lee, B.G., Seo, S.Y., Park, Y.C., Kim, J.M., Kim, H.M., and Yoo, Y.H. (2005). Phospho-ser 15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl-2 and Bcl-xL in eugenol-induced apoptosis. *Apoptosis* 10, 193-200.

Park, E.J., Chan, D.W., Park, J.H., Oettinger, M.A., and Kwon, J. (2003). DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic acids research* 31, 6819-6827.

Park, I.S., Koh, H.Y., Park, J.K., and Park, S.D. (1989). Two different mechanisms are involved for the bleomycin-induced DNA repair synthesis in permeabilized HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications* 164, 1226-1233.

Parlanti, E., Locatelli, G., Maga, G., and Dogliotti, E. (2007). Human base excision repair complex is physically associated to DNA replication and cell cycle regulatory proteins. *Nucleic acids research* 35, 1569-1577.

Parsons, J.L., Dianova, II, Allinson, S.L., and Dianov, G.L. (2005a). DNA polymerase beta promotes recruitment of DNA ligase III alpha-XRCC1 to sites of base excision repair. *Biochemistry* 44, 10613-10619.

Parsons, J.L., Dianova, II, Boswell, E., Weinfeld, M., and Dianov, G.L. (2005b). End-damage-specific proteins facilitate recruitment or stability of X-ray cross-complementing protein 1 at the sites of DNA single-strand break repair. *The FEBS journal* 272, 5753-5763.

Parsons, J.L., Dianova, II, and Dianov, G.L. (2004). APE1 is the major 3'-phosphoglycolate activity in human cell extracts. *Nucleic acids research* 32, 3531-3536.

- Pascucci, B., Russo, M.T., Crescenzi, M., Bignami, M., and Dogliotti, E. (2005). The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells. *Nucleic acids research* 33, 280-288.
- Paull, T.T., and Gellert, M. (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes & development* 13, 1276-1288.
- Peltomaki, P. (2003). Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 21, 1174-1179.
- Perkins, G., and Diffley, J.F. (1998). Nucleotide-dependent prereplicative complex assembly by Cdc6p, a homolog of eukaryotic and prokaryotic clamp-loaders. *Molecular cell* 2, 23-32.
- Petermann, E., Keil, C., and Oei, S.L. (2006). Roles of DNA ligase III and XRCC1 in regulating the switch between short patch and long patch BER. *DNA repair* 5, 544-555.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., and Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15, 289-302.
- Pion, E., Ullmann, G.M., Ame, J.C., Gerard, D., de Murcia, G., and Bombarda, E. (2005). DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation. *Biochemistry* 44, 14670-14681.
- Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., and Althaus, F.R. (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *The Journal of biological chemistry* 275, 40974-40980.
- Pogozelski, W.K., and Tullius, T.D. (1998). Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. *Chem Rev* 98, 1089-1108.
- Poirier, G.G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C., and Mandel, P. (1982). Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 3423-3427.
- Pommier, Y., Redon, C., Rao, V.A., Seiler, J.A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., *et al.* (2003). Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutation research* 532, 173-203.
- Pouliot, J.J., Robertson, C.A., and Nash, H.A. (2001). Pathways for repair of topoisomerase I covalent complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 6, 677-687.
- Pouliot, J.J., Yao, K.C., Robertson, C.A., and Nash, H.A. (1999). Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science (New York, NY)* 286, 552-555.
- Prasad, R., Dianov, G.L., Bohr, V.A., and Wilson, S.H. (2000). FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. *The Journal of biological chemistry* 275, 4460-4466.

Bibliographie

- Prasad, R., Lavrik, O.I., Kim, S.J., Kedar, P., Yang, X.P., Vande Berg, B.J., and Wilson, S.H. (2001). DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry* 276, 32411-32414.
- Prasad, R., Singhal, R.K., Srivastava, D.K., Molina, J.T., Tomkinson, A.E., and Wilson, S.H. (1996). Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *The Journal of biological chemistry* 271, 16000-16007.
- Puebla-Osorio, N., Lacey, D.B., Alt, F.W., and Zhu, C. (2006). Early embryonic lethality due to targeted inactivation of DNA ligase III. *Molecular and cellular biology* 26, 3935-3941.
- Pursell, Z.F., Isoz, I., Lundstrom, E.B., Johansson, E., and Kunkel, T.A. (2007). Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication. *Science (New York, NY)* 317, 127-130.
- Qu, T., Morii, E., Oboki, K., Lu, Y., and Morimoto, K. (2005). Micronuclei in EM9 cells expressing polymorphic forms of human XRCC1. *Cancer letters* 221, 91-95.
- Raschle, M., Marra, G., Nystrom-Lahti, M., Schar, P., and Jiricny, J. (1999). Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *The Journal of biological chemistry* 274, 32368-32375.
- Rasouli-Nia, A., Karimi-Busheri, F., and Weinfeld, M. (2004). Stable down-regulation of human polynucleotide kinase enhances spontaneous mutation frequency and sensitizes cells to genotoxic agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6905-6910.
- Ratnam, K., and Low, J.A. (2007). Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin Cancer Res* 13, 1383-1388.
- Ravanat, J.L., Douki, T., and Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of photochemistry and photobiology* 63, 88-102.
- Realini, C.A., and Althaus, F.R. (1992). Histone shuttling by poly(ADP-ribosylation). *The Journal of biological chemistry* 267, 18858-18865.
- Reardon, J.T., Bessho, T., Kung, H.C., Bolton, P.H., and Sancar, A. (1997). In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9463-9468.
- Reeves, W.H., and Stoeber, Z.M. (1989). Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *The Journal of biological chemistry* 264, 5047-5052.
- Restle, A., Janz, C., and Wiesmuller, L. (2005). Differences in the association of p53 phosphorylated on serine 15 and key enzymes of homologous recombination. *Oncogene* 24, 4380-4387.

- Rich, T., Allen, R.L., and Wyllie, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* *407*, 777-783.
- Ricke, R.M., and Bielinsky, A.K. (2004). Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase- α . *Molecular cell* *16*, 173-185.
- Rivera-Calzada, A., Maman, J.D., Spagnolo, L., Pearl, L.H., and Llorca, O. (2005). Three-dimensional structure and regulation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs). *Structure* *13*, 243-255.
- Roche, K.C., and Lowndes, N.F. (2007). An investigation into 53BP1 complex formation. *Advances in experimental medicine and biology* *604*, 47-57.
- Rossi, M.L., and Bambara, R.A. (2006). Reconstituted Okazaki fragment processing indicates two pathways of primer removal. *The Journal of biological chemistry* *281*, 26051-26061.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L.H., and Lobrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and cellular biology* *23*, 5706-5715.
- Ruf, A., Mennissier de Murcia, J., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1996). Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 7481-7485.
- Ruf, A., Rolli, V., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1998). The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. *Journal of molecular biology* *278*, 57-65.
- Ruscetti, T., Lehnert, B.E., Halbrook, J., Le Trong, H., Hoekstra, M.F., Chen, D.J., and Peterson, S.R. (1998). Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of biological chemistry* *273*, 14461-14467.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* *73*, 39-85.
- Sangrithi, M.N., Bernal, J.A., Madine, M., Philpott, A., Lee, J., Dunphy, W.G., and Venkitaraman, A.R. (2005). Initiation of DNA replication requires the RECQL4 protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *Cell* *121*, 887-898.
- Sawyer, S.L., Cheng, I.H., Chai, W., and Tye, B.K. (2004). Mcm10 and Cdc45 cooperate in origin activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular biology* *340*, 195-202.
- Saxena, A., Saffery, R., Wong, L.H., Kalitsis, P., and Choo, K.H. (2002). Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *The Journal of biological chemistry* *277*, 26921-26926.
- Sbodio, J.I., and Chi, N.W. (2002). Identification of a tankyrase-binding motif shared by IRAP, TAB182, and human TRF1 but not mouse TRF1. NuMA contains this RXXPDG motif and is a novel tankyrase partner. *The Journal of biological chemistry* *277*, 31887-31892.

Bibliographie

- Schichman, S.A., Canaani, E., and Croce, C.M. (1995). Self-fusion of the ALL1 gene. A new genetic mechanism for acute leukemia. *Jama* 273, 571-576.
- Schlegel, B.P., Starita, L.M., and Parvin, J.D. (2003). Overexpression of a protein fragment of RNA helicase A causes inhibition of endogenous BRCA1 function and defects in ploidy and cytokinesis in mammary epithelial cells. *Oncogene* 22, 983-991.
- Schlissel, M.S. (2002). Does artemis end the hunt for the hairpin-opening activity in V(D)J recombination? *Cell* 109, 1-4.
- Schneider, A., Smith, R.W., Kautz, A.R., Weisshart, K., Grosse, F., and Nasheuer, H.P. (1998). Primase activity of human DNA polymerase alpha-primase. Divalent cations stabilize the enzyme activity of the p48 subunit. *The Journal of biological chemistry* 273, 21608-21615.
- Schreiber, V., Ame, J.C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *The Journal of biological chemistry* 277, 23028-23036.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature reviews* 7, 517-528.
- Schwartz, J.L., Giovanazzi, S., and Weichselbaum, R.R. (1987). Recovery from sublethal and potentially lethal damage in an X-ray-sensitive CHO cell. *Radiation research* 111, 58-67.
- Sclafani, R.A., and Holzen, T.M. (2007). Cell Cycle Regulation of DNA Replication. *Annual review of genetics*.
- Seeberg, E., Eide, L., and Bjoras, M. (1995). The base excision repair pathway. *Trends in biochemical sciences* 20, 391-397.
- Sheaff, R.J., and Kuchta, R.D. (1994). Misincorporation of nucleotides by calf thymus DNA primase and elongation of primers containing multiple noncognate nucleotides by DNA polymerase alpha. *The Journal of biological chemistry* 269, 19225-19231.
- Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. (2004). ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nature cell biology* 6, 648-655.
- Shen, M.R., Zdzienicka, M.Z., Mohrenweiser, H., Thompson, L.H., and Thelen, M.P. (1998). Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA repair. *Nucleic acids research* 26, 1032-1037.
- Sheu, Y.J., and Stillman, B. (2006). Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression. *Molecular cell* 24, 101-113.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.

- Shiloh, Y. (1997). Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annual review of genetics* 31, 635-662.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3, 155-168.
- Shimada, M., and Nakanishi, M. (2006). DNA damage checkpoints and cancer. *Journal of molecular histology* 37, 253-260.
- Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Hilz, H., Hickey, R., Malkas, L., Applegren, N., Wu, Y., Bers, G., and Smulson, M.E. (1996). The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. *Biochemistry* 35, 11622-11633.
- Simbulan, C.M., Suzuki, M., Izuta, S., Sakurai, T., Savoysky, E., Kojima, K., Miyahara, K., Shizuta, Y., and Yoshida, S. (1993). Poly(ADP-ribose) polymerase stimulates DNA polymerase alpha by physical association. *The Journal of biological chemistry* 268, 93-99.
- Slattery, E., Dignam, J.D., Matsui, T., and Roeder, R.G. (1983). Purification and analysis of a factor which suppresses nick-induced transcription by RNA polymerase II and its identity with poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of biological chemistry* 258, 5955-5959.
- Smirnova, E., Toueille, M., Markkanen, E., and Hubscher, U. (2005). The human checkpoint sensor and alternative DNA clamp Rad9-Rad1-Hus1 modulates the activity of DNA ligase I, a component of the long-patch base excision repair machinery. *The Biochemical journal* 389, 13-17.
- Smith, G.C., and Jackson, S.P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes & development* 13, 916-934.
- Smith, L.M., Willmore, E., Austin, C.A., and Curtin, N.J. (2005). The novel poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitor, AG14361, sensitizes cells to topoisomerase I poisons by increasing the persistence of DNA strand breaks. *Clin Cancer Res* 11, 8449-8457.
- Smith, S., Gariat, I., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science (New York, NY)* 282, 1484-1487.
- Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer cell* 3, 247-258.
- Sossou, M., Flohr-Beckhaus, C., Schulz, I., Daboussi, F., Epe, B., and Radicella, J.P. (2005). APE1 overexpression in XRCC1-deficient cells complements the defective repair of oxidative single strand breaks but increases genomic instability. *Nucleic acids research* 33, 298-306.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer research* 64, 2390-2396.

Bibliographie

Stokes, M.P., and Michael, W.M. (2003). DNA damage-induced replication arrest in *Xenopus* egg extracts. *The Journal of cell biology* *163*, 245-255.

Stokes, M.P., Van Hatten, R., Lindsay, H.D., and Michael, W.M. (2002). DNA replication is required for the checkpoint response to damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *The Journal of cell biology* *158*, 863-872.

Strumberg, D., Pilon, A.A., Smith, M., Hickey, R., Malkas, L., and Pommier, Y. (2000). Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Molecular and cellular biology* *20*, 3977-3987.

Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S.H., Hubscher, U., and Dogliotti, E. (1998). Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* *17*, 835-843.

Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., and Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 13182-13187.

Takahashi, T., Tada, M., Igarashi, S., Koyama, A., Date, H., Yokoseki, A., Shiga, A., Yoshida, Y., Tsuji, S., Nishizawa, M., *et al.* (2007). Aprataxin, causative gene product for EAOH/AOA1, repairs DNA single-strand breaks with damaged 3'-phosphate and 3'-phosphoglycolate ends. *Nucleic acids research* *35*, 3797-3809.

Takanami, T., Nakamura, J., Kubota, Y., and Horiuchi, S. (2005). The Arg280His polymorphism in X-ray repair cross-complementing gene 1 impairs DNA repair ability. *Mutation research* *582*, 135-145.

Takashima, H., Boerkoel, C.F., John, J., Saifi, G.M., Salih, M.A., Armstrong, D., Mao, Y., Quioco, F.A., Roa, B.B., Nakagawa, M., *et al.* (2002). Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nature genetics* *32*, 267-272.

Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal* *17*, 5497-5508.

Taylor, R.M., Moore, D.J., Whitehouse, J., Johnson, P., and Caldecott, K.W. (2000). A cell cycle-specific requirement for the XRCC1 BRCT II domain during mammalian DNA strand break repair. *Molecular and cellular biology* *20*, 735-740.

Taylor, R.M., Thistlethwaite, A., and Caldecott, K.W. (2002). Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Molecular and cellular biology* *22*, 2556-2563.

- Taylor, R.M., Wickstead, B., Cronin, S., and Caldecott, K.W. (1998). Role of a BRCT domain in the interaction of DNA ligase III- α with the DNA repair protein XRCC1. *Curr Biol* 8, 877-880.
- Tebbs, R.S., Flannery, M.L., Meneses, J.J., Hartmann, A., Tucker, J.D., Thompson, L.H., Cleaver, J.E., and Pedersen, R.A. (1999). Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development. *Developmental biology* 208, 513-529.
- Theis, J.F., and Newlon, C.S. (2001). Two compound replication origins in *Saccharomyces cerevisiae* contain redundant origin recognition complex binding sites. *Molecular and cellular biology* 21, 2790-2801.
- Thomas, D.C., Roberts, J.D., and Kunkel, T.A. (1991). Heteroduplex repair in extracts of human HeLa cells. *The Journal of biological chemistry* 266, 3744-3751.
- Thompson, L.H., Brookman, K.W., Dillehay, L.E., Carrano, A.V., Mazrimas, J.A., Mooney, C.L., and Minkler, J.L. (1982). A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. *Mutation research* 95, 427-440.
- Thompson, L.H., Brookman, K.W., Jones, N.J., Allen, S.A., and Carrano, A.V. (1990). Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Molecular and cellular biology* 10, 6160-6171.
- Thompson, L.H., and West, M.G. (2000). XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutation research* 459, 1-18.
- Tibbetts, R.S., Cortez, D., Brumbaugh, K.M., Scully, R., Livingston, D., Elledge, S.J., and Abraham, R.T. (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes & development* 14, 2989-3002.
- Timson, D.J., Singleton, M.R., and Wigley, D.B. (2000). DNA ligases in the repair and replication of DNA. *Mutation research* 460, 301-318.
- Toueille, M., and Hubscher, U. (2004). Regulation of the DNA replication fork: a way to fight genomic instability. *Chromosoma* 113, 113-125.
- Trincao, J., Johnson, R.E., Escalante, C.R., Prakash, S., Prakash, L., and Aggarwal, A.K. (2001). Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase ϵ : implications for translesion DNA synthesis. *Molecular cell* 8, 417-426.
- Trujillo, K.M., Yuan, S.S., Lee, E.Y., and Sung, P. (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *The Journal of biological chemistry* 273, 21447-21450.
- Tsurimoto, T., Melendy, T., and Stillman, B. (1990). Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at the SV40 DNA replication origin. *Nature* 346, 534-539.

Bibliographie

- Tsurimoto, T., and Stillman, B. (1991). Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. II. Switching of DNA polymerase alpha and delta during initiation of leading and lagging strand synthesis. *The Journal of biological chemistry* 266, 1961-1968.
- Tuimala, J., Szekely, G., Gundy, S., Hirvonen, A., and Norppa, H. (2002). Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. *Carcinogenesis* 23, 1003-1008.
- Tutt, A., and Ashworth, A. (2002). The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends in molecular medicine* 8, 571-576.
- Uchiyama, M., Griffiths, D., Arai, K., and Masai, H. (2001). Essential role of Sna41/Cdc45 in loading of DNA polymerase alpha onto minichromosome maintenance proteins in fission yeast. *The Journal of biological chemistry* 276, 26189-26196.
- Unsal-Kacmaz, K., Makhov, A.M., Griffith, J.D., and Sancar, A. (2002). Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6673-6678.
- Vairapandi, M., Balliet, A.G., Hoffman, B., and Liebermann, D.A. (2002). GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *Journal of cellular physiology* 192, 327-338.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2, 196-206.
- van Heemst, D., Brugmans, L., Verkaik, N.S., and van Gent, D.C. (2004). End-joining of blunt DNA double-strand breaks in mammalian fibroblasts is precise and requires DNA-PK and XRCC4. *DNA repair* 3, 43-50.
- Vidal, A.E., Boiteux, S., Hickson, I.D., and Radicella, J.P. (2001). XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *The EMBO journal* 20, 6530-6539.
- Vidal, A.E., Kannouche, P., Podust, V.N., Yang, W., Lehmann, A.R., and Woodgate, R. (2004). Proliferating cell nuclear antigen-dependent coordination of the biological functions of human DNA polymerase iota. *The Journal of biological chemistry* 279, 48360-48368.
- von Kobbe, C., Harrigan, J.A., May, A., Opresko, P.L., Dawut, L., Cheng, W.H., and Bohr, V.A. (2003). Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase 1 complex in the poly(ADP-ribosylation) pathway after DNA damage. *Molecular and cellular biology* 23, 8601-8613.
- Waga, S., and Stillman, B. (1994). Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 369, 207-212.
- Waga, S., and Stillman, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry* 67, 721-751.

- Walter, J., and Newport, J. (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Molecular cell* 5, 617-627.
- Walter, J.C. (2000). Evidence for sequential action of cdc7 and cdk2 protein kinases during initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *The Journal of biological chemistry* 275, 39773-39778.
- Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B., and Elledge, S.J. (2002). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science (New York, NY)* 298, 1435-1438.
- Wang, D., Kreutzer, D.A., and Essigmann, J.M. (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation research* 400, 99-115.
- Wang, H., Perrault, A.R., Takeda, Y., Qin, W., Wang, H., and Iliakis, G. (2003a). Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic acids research* 31, 5377-5388.
- Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., and Iliakis, G. (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer research* 65, 4020-4030.
- Wang, J.D., Sanders, G.M., and Grossman, A.D. (2007). Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell* 128, 865-875.
- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., and Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic acids research* 34, 6170-6182.
- Wang, Y., Spitz, M.R., Zhu, Y., Dong, Q., Shete, S., and Wu, X. (2003b). From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA repair* 2, 901-908.
- Wang, Z.Q., Stingl, L., Morrison, C., Jantsch, M., Los, M., Schulze-Osthoff, K., and Wagner, E.F. (1997). PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes & development* 11, 2347-2358.
- Washington, M.T., Johnson, R.E., Prakash, L., and Prakash, S. (2004). Human DNA polymerase iota utilizes different nucleotide incorporation mechanisms dependent upon the template base. *Molecular and cellular biology* 24, 936-943.
- Weisshart, K., Forster, H., Kremmer, E., Schlott, B., Grosse, F., and Nasheuer, H.P. (2000). Protein-protein interactions of the primase subunits p58 and p48 with simian virus 40 T antigen are required for efficient primer synthesis in a cell-free system. *The Journal of biological chemistry* 275, 17328-17337.
- Weterings, E., and van Gent, D.C. (2004). The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA repair* 3, 1425-1435.

Bibliographie

- Weterings, E., Verkaik, N.S., Bruggenwirth, H.T., Hoeijmakers, J.H., and van Gent, D.C. (2003). The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic acids research* *31*, 7238-7246.
- Whitby, M.C. (2005). Making crossovers during meiosis. *Biochemical Society transactions* *33*, 1451-1455.
- Whitehouse, C.J., Taylor, R.M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D.D., Weinfeld, M., and Caldecott, K.W. (2001). XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell* *104*, 107-117.
- Wiederhold, L., Leppard, J.B., Kedar, P., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Weinfeld, M., Tomkinson, A.E., Izumi, T., Prasad, R., Wilson, S.H., *et al.* (2004). AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Molecular cell* *15*, 209-220.
- Wilson, D.M., 3rd, and Barsky, D. (2001). The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutation research* *485*, 283-307.
- Winters, T.A., Russell, P.S., Kohli, M., Dar, M.E., Neumann, R.D., and Jorgensen, T.J. (1999). Determination of human DNA polymerase utilization for the repair of a model ionizing radiation-induced DNA strand break lesion in a defined vector substrate. *Nucleic acids research* *27*, 2423-2433.
- Wobbe, C.R., Dean, F., Weissbach, L., and Hurwitz, J. (1985). In vitro replication of duplex circular DNA containing the simian virus 40 DNA origin site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *82*, 5710-5714.
- Wong, H.K., Kim, D., Hogue, B.A., McNeill, D.R., and Wilson, D.M., 3rd (2005). DNA damage levels and biochemical repair capacities associated with XRCC1 deficiency. *Biochemistry* *44*, 14335-14343.
- Woo, R.A., McLure, K.G., Lees-Miller, S.P., Rancourt, D.E., and Lee, P.W. (1998). DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* *394*, 700-704.
- Wood, A., Garg, P., and Burgers, P.M. (2007). A ubiquitin-binding motif in the translesion DNA polymerase Rev1 mediates its essential functional interaction with ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* *282*, 20256-20263.
- Xu, B., O'Donnell, A.H., Kim, S.T., and Kastan, M.B. (2002). Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer research* *62*, 4588-4591.
- Yang, X.H., and Zou, L. (2006). Recruitment of ATR-ATRIP, Rad17, and 9-1-1 complexes to DNA damage. *Methods in enzymology* *409*, 118-131.

- Yang, Y.G., Cortes, U., Patnaik, S., Jasin, M., and Wang, Z.Q. (2004). Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. *Oncogene* 23, 3872-3882.
- Yarden, R.I., and Papa, M.Z. (2006). BRCA1 at the crossroad of multiple cellular pathways: approaches for therapeutic interventions. *Molecular cancer therapeutics* 5, 1396-1404.
- Yazdi, P.T., Wang, Y., Zhao, S., Patel, N., Lee, E.Y., and Qin, J. (2002). SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes & development* 16, 571-582.
- Yelamos, J., Monreal, Y., Saenz, L., Aguado, E., Schreiber, V., Mota, R., Fuente, T., Minguela, A., Parrilla, P., de Murcia, G., *et al.* (2006). PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes. *The EMBO journal* 25, 4350-4360.
- Yoshihara, K., Tanaka, Y., Itaya, A., Kamiya, T., Hironaka, T., Minaga, T., and Koide, S.S. (1989). In vitro Evidence for Poly(ADP-Ribosylation) of DNA Polymerase alpha-Primase and Phosphorylation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase by Protein Kinase C. In *ADP-Ribose Transfer Reactions - Mechanisms and Biological Significance*, M.K. Jacobson, and E.L. Jacobson, eds. (Springer-Verlag), pp. 39-46.
- Yu, M., Schreek, S., Cerni, C., Schamberger, C., Lesniewicz, K., Poreba, E., Vervoorts, J., Walsemann, G., Grotzinger, J., Kremmer, E., *et al.* (2005). PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation. *Oncogene* 24, 1982-1993.
- Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science (New York, NY)* 297, 259-263.
- Yu, X., Chini, C.C., He, M., Mer, G., and Chen, J. (2003a). The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science (New York, NY)* 302, 639-642.
- Yu, Y., Wang, W., Ding, Q., Ye, R., Chen, D., Merkle, D., Schriemer, D., Meek, K., and Lees-Miller, S.P. (2003b). DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination. *DNA repair* 2, 1239-1252.
- Yun, S., Lie, A.C.C., and Porter, A.C. (2004). Discriminatory suppression of homologous recombination by p53. *Nucleic acids research* 32, 6479-6489.
- Zahradka, P., and Ebisuzaki, K. (1982). A shuttle mechanism for DNA-protein interactions. The regulation of poly(ADP-ribose) polymerase. *European journal of biochemistry / FEBS* 127, 579-585.
- Zdzienicka, M.Z., van der Schans, G.P., Natarajan, A.T., Thompson, L.H., Neuteboom, I., and Simons, J.W. (1992). A Chinese hamster ovary cell mutant (EM-C11) with sensitivity to simple alkylating agents and a very high level of sister chromatid exchanges. *Mutagenesis* 7, 265-269.

Bibliographie

Zerbe, L.K., and Kuchta, R.D. (2002). The p58 subunit of human DNA primase is important for primer initiation, elongation, and counting. *Biochemistry* *41*, 4891-4900.

Zhang, X., Morera, S., Bates, P.A., Whitehead, P.C., Coffey, A.I., Hainbucher, K., Nash, R.A., Sternberg, M.J., Lindahl, T., and Freemont, P.S. (1998). Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module. *The EMBO journal* *17*, 6404-6411.

Zhao, H., Watkins, J.L., and Piwnica-Worms, H. (2002). Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 14795-14800.

Zhao, S., Weng, Y.C., Yuan, S.S., Lin, Y.T., Hsu, H.C., Lin, S.C., Gerbino, E., Song, M.H., Zdzienicka, M.Z., Gatti, R.A., *et al.* (2000). Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* *405*, 473-477.

Zlotkin, T., Kaufmann, G., Jiang, Y., Lee, M.Y., Uitto, L., Syvaoja, J., Dornreiter, I., Fanning, E., and Nathanel, T. (1996). DNA polymerase epsilon may be dispensable for SV40- but not cellular-DNA replication. *The EMBO journal* *15*, 2298-2305.

Zou, L., Cortez, D., and Elledge, S.J. (2002). Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes & development* *16*, 198-208.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (New York, NY)* *300*, 1542-1548.

Zou, L., Mitchell, J., and Stillman, B. (1997). CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication. *Molecular and cellular biology* *17*, 553-563.

Liste des communications écrites et orales

Publications :

- Lévy, N., Martz, A., Bresson, A., Spenlehauer, C., de Murcia, G. and Ménissier de Murcia, J. (2006) XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage. *Nucleic Acids Research*, **34**, 32-41.
- Lévy, N., Oehlmann, M., Delalande, F., Nasheuer, H.P., Van Dorsselaer A., Schreiber V., Ménissier de Murcia J., de Murcia, G., Maiorano, D. and Bresson A. XRCC1 interacts with DNA primase to regulate replication fork progression in the presence of DNA damage. *Soumission à EMBO Journal décembre 2007*.

Communications orales :

- Second PARP Regio Meeting, Université de Zurich, Suisse, 8 avril 2005 :
The Human DNA Single Strand Break Repair Factor XRCC1 is required for Nonhomologous DNA End-Joining.
- Sixième Colloque des 3R, Presqu'île de Giens, 19-22 juin 2005 :
XRCC1 est phosphorylé par DNA-PK et est impliqué dans le mécanisme de réparation des cassures double-brin de l'ADN par NHEJ.
- Journées Scientifiques du Campus d'Illkirch, 15-16 septembre 2005 :
XRCC1, une protéine clef dans la réponse cellulaire aux cassures dans l'ADN.

Prix « Jean-Claude Stoclet » pour la meilleure présentation orale

Poster :

- Rencontres « DNA Repair : from Molecular Mechanism to Human Disease », Noordwijkerhout, Pays-Bas, 2-7 avril 2006 :
XRCC1 is phosphorylated by DNA-PK in response to DNA damage.

Lévy, N., Martz, A., Bresson, A., Spenlehauer, C., de Murcia, G. and Ménissier de Murcia, J.

Résumé

XRCC1 est un facteur central des voies de réparation des cassures simple brin (SSBR) ou des bases endommagées (BER). Il organise un réseau complexe d'interactions protéiques avec les acteurs de la réparation grâce à ses domaines BRCT1 et BRCT2. Le domaine BRCT1 interagit avec l'enzyme qui détecte et signale les cassures dans l'ADN, PARP-1, ainsi qu'avec le poly(ADP-ribose) (PAR), permettant son recrutement rapide au site de dommage.

Afin de mieux comprendre les fonctions du domaine BRCT1 de XRCC1 dans la réparation des dommages de l'ADN, nous avons cherché à isoler de nouveaux partenaires par une approche protéomique s'appuyant sur la spectrométrie de masse. Nous avons identifié deux nouveaux partenaires : la sous unité catalytique de la protéine kinase DNA-PK impliquée dans la réparation de l'ADN par recombinaison non homologue (NHEJ) et la sous unité p58 du complexe ADN polymérase α -primase impliqué dans la répllication de l'ADN.

XRCC1 interagit avec DNA-PK et stimule son activité *in vitro* de phosphorylation de la sérine 15 de p53. En retour, XRCC1 est phosphorylé par DNA-PK au niveau de sa sérine 371 en réponse à une exposition aux rayonnements X et cette phosphorylation régule la transition entre une forme monomère et une forme dimère de XRCC1 et est requise pour la réparation efficace des cassures double brin *in vitro*. Le mutant non phosphorylable XRCC1-S371L perd sa capacité à stimuler DNA-PK, et induit un défaut de réparation des cassures double brin induites par des rayonnements X. Nos résultats suggèrent que XRCC1 pourrait recruter DNA-PK pour engager la voie de réparation NHEJ lorsqu'une cassure simple-brin a été convertie en cassure double-brin lors de la phase S.

XRCC1 interagit par son domaine BRCT1 avec la sous-unité p58 du complexe replicatif Pol α -primase et les deux protéines co-localisent *in vivo*. Nous montrons que p58 lie le PAR ce qui entraîne l'inhibition de l'activité primase. La surexpression du domaine BRCT1 de XRCC1 dans des cellules HeLa induit l'hétéromodification du domaine BRCT1 surexprimé et l'accumulation des cellules en début de phase S après traitement par un agent alkylant. Nous montrons que ce blocage de la répllication a lieu entre la formation des complexes de pré-initiation et le recrutement de PCNA, et qu'elle est dépendante de la synthèse de PAR. Ce travail révèle une nouvelle fonction de XRCC1 et du PAR, qui est de réguler l'initiation de la répllication lorsque l'ADN est endommagé.

L'ensemble de nos résultats décrivent XRCC1 et PARP-1 comme des éléments centraux de la coordination entre réparation et répllication de l'ADN, ainsi que dans la transition entre SSBR et DSBR. Lors de la répllication d'un ADN endommagé, le couple XRCC1/PARP-1, via le PAR porté par le domaine BRCT1 de XRCC1, freine l'avancement de la fourche de répllication en interagissant avec p58, inhibant de la sorte l'ADN primase. Ceci permettrait à la cellule de réparer les lésions présentes sur l'ADN afin d'éviter la collision entre la fourche de répllication et une cassure simple-brin de l'ADN non réparée. Néanmoins, en cas de conversion du SSB en DSB, XRCC1 stimule l'activité de DNA-PK afin de promouvoir la réparation du DSB.

Abstract

XRCC1 is a central player of single strand break (SSBR) and base excision (BER) pathways, organizing a complex protein interaction network with repair factors through its two BRCT domains. The BRCT1 domain interacts with both PARP-1, the enzyme that detects and signals DNA interruptions, and poly(ADP-ribose) (PAR), allowing its immediate recruitment to the DNA damaged sites.

To get insights into the functions of the XRCC1 BRCT1 domain in the repair of DNA damages, we looked for new interactants by a mass spectrometry based proteomic approach, and identified two new partners : the protein kinase DNA-PK involved in Non Homologous End Joining (NHEJ) repair pathway, and the p58 subunit of the replicative DNA polymerase α -primase complex.

XRCC1 interacts with DNA-PK and stimulates its *in vitro* kinase activity on serine 15 of p53. In turn, XRCC1 is phosphorylated by DNA-PK on serine 371 in response to ionizing radiation. This phosphorylation controls the transition between a dimer and a monomer state of XRCC1 and is required for efficient DNA double-strand break repair (DSBR) as the non-phosphorylable mutant S371L was unable to stimulate DNA-PK and leads to unrepaired DSB induced by ionizing radiations. Our results suggest that XRCC1 could recruit DNA-PK to engage the NHEJ repair pathway when a SSB is converted to a DSB during S-phase.

XRCC1 interacts through its BRCT1 domain with the p58 subunit of the DNA-Pol α -primase complex and the two proteins colocalize *in vivo*. The binding of PAR to p58 inhibits the activity of the DNA-primase. Overexpression of XRCC1 BRCT1 domain in HeLa cells induces BRCT1 domain heteromodification and accumulation of cells in early S-phase. We show that this replication arrest occurs between the assembly of pre-initiation complexes and the loading of PCNA to chromatin, and that it requires PAR synthesis. This work reveals a novel function for XRCC1 and PAR in the regulation of replication initiation when DNA is damaged.

Altogether, our results reveal XRCC1 and PARP-1 as key components in the coordination between DNA replication and repair, and in the SSBR to DSBR transition. During replication of damaged DNA, XRCC1 and PARP-1, through the heteromodified XRCC1 BRCT1 domain, inhibits replication fork assembly and progression by interacting with p58, thus inhibiting DNA-primase activity. This would allow the cell to repair SSBs before they are converted to DSBs by collision with replication fork. Despite this process, if DSB are generated during replication of damaged DNA, XRCC1 can act as a molecular switch, stimulating DNA-PK to promote repair of DSBs by NHEJ.

Mots Clés : XRCC1, PARP-1, ADN polymérase α -primase, DNA-PK, répllication, réparation de l'ADN

Laboratoire : Dpt Intégrité Du Génome, UMR 7175, ESBS, Bd S. Brant, BP 10413, 67412 Illkirch CEDEX