

Université de Montréal

**Étude protéomique des partenaires d'interaction de
XPA en présence et en absence de dommage à l'ADN**

Par

Meriem Sekheri

Programme de biologie moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en biologie moléculaire

Août 2015

© Meriem Sekheri, 2015

Résumé

La réparation par excision de nucléotides (NER) permet l'élimination des lésions provoquant une distorsion de la double hélice de l'ADN. Ces lésions sont induites par plusieurs agents environnementaux comme les rayons UV, ainsi que par certaines drogues chimio- thérapeutiques tel que le cisplatine. Des défauts dans la NER conduisent à de rares maladies autosomiques héréditaires : La xérodermie pigmentaire (XP), le syndrome de Cockayne (CS), le syndrome de sensibilité aux UV^S et la trichothiodystrophie (TTD). Ces maladies sont associées soit à une prédisposition élevée au cancer de la peau et / ou à de graves anomalies du développement neurologique. Le groupe de patients XP-A représente le deuxième groupe (XP) le plus fréquent, et possède la forme la plus sévère combinant cancer de la peau avec un haut risque de dégénérescence neurologique. À date, aucune explication n'a été proposée pour les symptômes neurologiques observés chez ces patients. Nous avons suggéré ainsi que la protéine XPA possède d'autres fonctions dans d'autres processus cellulaires, ceci en interagissant avec des partenaires protéiques différents de ceux déjà connus. Afin de confirmer cette hypothèse nous avons réalisé une étude protéomique à grande échelle en combinant la spectrométrie de masse à une immunoprécipitation en Tandem d'affinité (TAP), afin d'identifier de nouvelles protéines interagissant directement avec XPA. Nous avons montré que XPA peut interagir avec MRE11, la protéine clé de la réparation par recombinaison homologue. Des études additionnelles sont requises pour confirmer cette interaction et comprendre sa fonction

Mots clés: Ultra violet, réparation par excision de nucléotides, xérodermie pigmentaire, *xeroderma pigmentosum group A-complementing protein* (XPA).

Abstract

To maintain genome integrity and ensure the continuation of transcription, helix distorting DNA lesions induced by UV and other environmental mutagens are eliminated through a highly-versatile DNA repair pathway: nucleotide excision repair (NER). Mutations in 11 genes (XPC, XPE, XPB, XPD, XPG, XPA, XPD, TTD-A, CSA, CSB and UVSSA), among the 30 genes directly involved in NER, have been associated with the human genetic disorders: xeroderma pigmentosum (XP), cockayne syndrome (CS), trichothiodystrophy (TTD), and UV-sensitive syndrome (UV^{SS}). Patients of these syndromes display a wide variety of clinical features that range from normal development with extreme predisposition to cancer, to neurodevelopmental defects associated with premature aging abnormalities. The connection between DNA damage and neurodegeneration remains unclear, i.e. cannot be explained by a DNA-repair deficiency alone, implying that various repair factors perform other functions beyond the repair process. XP-A is the second most common form of XP. XP-A cells have very low levels of NER activity and are sensitive to killing by UV light. It is one of the most severely affected XP groups, with the onset of cutaneous features, skin cancer, ocular features, and severe early onset neurological disease. Therefore we hypothesize that XPA interacts with cellular proteins that regulate its functions either in UV damage repair or in neurological development. To test this, our major aim was to carry out a large-scale proteomics investigation to identify novel interacting partners for XPA in the absence or presence of genotoxic stress, thus providing clues on the origins of neurodegeneration observed in many XP-A patients. We provide evidence that XPA can interact with MRE11, the key factor in repair of double strand breaks by homologous Recombination.

Future experiments will be aimed at determining the impact of the XPA/MRE11 interaction functions in cells.

Keywords: Ultra violet, Nucleotide excision repair, xeroderma pigmentosum, Xeroderma pigmentosum group A-complementing protein (XPA).

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Table des matières	iv
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements.....	xiii
Introduction	1
Les différents types de dommages à l'ADN.....	2
<i>L'oxydation de l'ADN.....</i>	<i>2</i>
<i>L'alkylation de l'ADN</i>	<i>3</i>
<i>La formation des sites abasiques.....</i>	<i>3</i>
<i>Les cassures de l'ADN.....</i>	<i>4</i>
<i>Les pontages intercaténares</i>	<i>5</i>
<i>Les mésappariements des bases.....</i>	<i>5</i>
Les voies de réparation des dommages à l'ADN.....	6
<i>La réparation par excision des bases</i>	<i>6</i>
<i>La réparation des cassures double brin</i>	<i>7</i>
<i>La réparation des pontages intercaténares.....</i>	<i>8</i>
<i>La réparation des mésappariements des bases</i>	<i>9</i>

La réponse aux dommages à l'ADN.....	11
La synthèse translésionnelle	14
Les dommages à l'ADN induits par les UV	16
Les dommages à l'ADN par le Cisplatine.....	18
La réparation par excision des nucléotides	19
Activation d'ATR après dommage à l'ADN par les UV	25
Les maladies liées à une déficience au niveau de la NER	26
<i>La xérodermie pigmentaire</i>	<i>26</i>
<i>Le syndrome de cockayne</i>	<i>27</i>
<i>Le syndrome de sensibilité aux UV (UVSS)</i>	<i>28</i>
<i>La trichothiodystrophie</i>	<i>28</i>
<i>Les syndromes combinés</i>	<i>29</i>
Problématique de recherche.....	31
Hypothèse et objectifs.....	36
Matériel et Méthodes.....	38
<i>Culture cellulaire</i>	<i>38</i>
<i>Construction des plasmides exprimant XPA-Flag-HA</i>	<i>38</i>
<i>Création de lignées cellulaires stables exprimant XPA-Flag-HA</i>	<i>40</i>
<i>Immunobuvardage.....</i>	<i>41</i>
<i>Les anticorps</i>	<i>42</i>

<i>Immunofluorescence</i>	42
<i>Purification des complexes protéiques par la méthode TAP</i>	43
<i>La co-immunoprécipitation</i>	44
<i>Déplétion des protéines par les petits ARN d`interférence</i>	45
<i>Traitement aux agents mutagènes</i>	45
<i>Irradiation aux UV</i>	45
<i>Traitement aux radiations Gamma</i>	46
<i>Traitement au CDDP</i>	46
<i>Test de survie cellulaire</i>	46
<i>Essai de réparation des 6-4PP en fonction du cycle cellulaire</i>	47
Résultats	49
<i>Expression de XPA qui est doublement marquée à Flag et HA dans les HeLa-S</i> .	49
<i>Traitement des lignées stables au cisplatine</i>	51
<i>Purification des complexes protéiques de XPA par la méthode en tandem d`affinité (TAP)</i>	52
<i>Criblage par les petits ARN interférents</i>	57
<i>Effet de la déplétion des partenaires potentiels de XPA sur la survie cellulaire</i>	60
<i>Le rôle des cohésines et des protéines du complexe MRN dans la NER</i>	63
<i>Validation des nouvelles interactions par immunoprécipitation</i>	69
Discussion	71

<i>Rappel du projet</i>	71
<i>Expression de XPA-Flag-HA</i>	72
<i>Les partenaires protéiques de XPA</i>	72
<i>Résultat du criblage</i>	75
Conclusion	79
Les limites de l'étude	80
Expériences futures	82
Bibliographie	84

Liste des figures

Figure 1: Les différents types de dommages à l'ADN et les voies de réparation correspondantes.

Figure 2 : Mécanismes de la réparation de l'ADN par excision des nucléotides.

Figure 3 : Diagrammes des vecteurs pENTR/D-TOPO (a), et MSCV-Flag-HA (b).

Figure 4 : Détection de XPA-Flag-HA dans les cellules HeLa-S par immunofluorescence.

Figure 5 : Induction de γ H2AX et pChk1 dans les cellules HeLa-S-XPA-Flag-HA après traitement au CDDP.

Figure 6 : Purification des partenaires protéiques de XPA en présence et en absence de dommage à l'ADN.

Figure 7 : La réparation des 6-4PP en fonction du cycle cellulaire après déplétion des partenaires potentiels de XPA.

Figure 8 : La survie clonogénique après traitement au cisplatine des cellules HeLa déplétées des partenaires potentiels de XPA.

Figure 9: La survie clonogénique après irradiation aux UVC des cellules HeLa déplétées des partenaires potentiels de XPA.

Figure 10 : La survie clonogénique après irradiation à 4Gy de rayons γ des cellules HeLa déplétées des partenaires potentiels de XPA.

Figure 11: Cinétique de réparation des 6-4PP dans les cellules HeLa irradiées à 25J d'UVC après déplétion de SMC1 et SMC3.

Figure 12 : Pourcentage des 6-4PP réparés après 3h et 6h de temps d'irradiation des cellules HeLa déplétées de WAPL et Rad21.

Figure 13 : Taux de réparation des 6-4 PP après irradiation des cellules déplétées de Rad50 avec $25\text{J}/\text{m}^2$ d'UVC.

Figure 14 : Co-immunoprécipitation des protéines sélectionnées en présence et en absence de cisplatine.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP sites	Sites abasiques
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
ATRIP	<i>ATR interaction protein</i>
BER	Réparation par Excision de Bases
CDB	Cassures double brin
CEP164	<i>Centrosomal protein of 164 kDa</i>
Chk 1	<i>Serine/threonine-protein kinase 1</i>
Chk 2	<i>Serine/threonine-protein kinase 2</i>
co-IP	Co-immunoprécipitation
CPDs	Dimères de cyclobutane pyrimidique
CS	Syndrome de cockayne
CSA	<i>Cockayne syndrome protein A</i>
CSB	<i>Cockayne syndrome protein B</i>
DDR	Réponse aux dommages à l'ADN
DNA-PK	Protéine kinase dépendante de l'ADN
GG-NER	Réparation par excision de nucléotides génomique globale
ICL	Pontages intercaténares de l'ADN
IR	Radiations ionisantes
Ku70/Ku80	<i>70 kDa/ 80kDa subunit of Ku antigen</i>

MLH1	Protéine de la réparation des mésappariements Mlh1
MMR	Réparation des mésappariements
MSH2-MSH3- MSH6	Protéines de la réparation des mésappariements Msh2, Msh3, Msh6
NHEJ	Jonction d'extrémités non homologues
HR	Recombinaison homologue
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAM	S-adénosylméthionine
SiRNA	Petits ARN interférents
SIRT1	Sirtuine 1
SSBs	Cassures simple brin de l'ADN
ssDNA	ADN monocaténaire
TC-NER	Réparation par excision de nucléotides couplée à la transcription
TFIIH	Facteur général de transcription IIH
TLS	Synthèse translésionnelle
TOP1	Topoisomerase I
TTD	Trichithiodytrophie
UV	Ultra Violet
UVSS	Syndrome de sensibilité aux UV
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group A</i>
XPB	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group B</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group D</i>
XPE	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group E</i>

XPF	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group F</i>
XPG	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group G</i>
XRCC4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 4</i>
mL	Millilitre
µg	Micro gramme
µL	Micro litre
6-4PP	6-4 photoproducts
8-OxoG	8-Oxoguanine

Remerciements

En premier lieu je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Elliot Drobetsky. Merci Elliot de m`avoir accueilli dans ton laboratoire, de m`avoir proposé un sujet très intéressant et m`avoir laissé la liberté de l`orienter au cours du déroulement de ma maîtrise. Enfin, j`ai été extrêmement sensible à tes qualités humaines d`écoute et de compréhension tout au long de ma maîtrise.

Ma considération et mon respect sont adressés aux membres de mon jury pour le temps qu`ils consacrent pour la correction de mon travail surtout en cette période de vacances.

Mes remerciements vont aussi aux membres de notre équipe en particulier Dr François Bélanger, pour son aide précieuse dans l`application des plans des expériences et dans l`interprétation des résultats. Sa compétence et sa disponibilité ont toujours été pour moi une source d`encouragement. Un grand merci à mes amis Soukaina Mansouri et Jean-Philippe Angers, pour leur aide, et pour la bonne ambiance qu`ils créaient dans le laboratoire. Un merci aussi au nouvel étudiant Émile Fortier pour ses blagues qui me font toujours rire.

Je voudrais aussi remercier le Dr El Bachir Affar pour ses critiques pertinentes. Je désire aussi remercier Nazar Mashtalir et Salima Daou pour leur aide lors de la purification des complexes. Qu`ils trouvent ici l`expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

Ces deux années de maîtrise m`ont également permis de rencontrer des personnes que j`apprécie énormément, notamment Amani , Amina, Imene, Nesrine, Samy et Youcef

khoudja qui sont devenus de très chères amis. Je leurs adresse toute ma reconnaissance pour leur amitié. Je remercie sincèrement mon ami d'enfance Dr Amel Lamraoui, même si des continents nous séparent Amal est toujours dans mon cœur, Afaf Khelil, Amina, Yasmia, Kahina, Sorore, Nesrine et Naima je vous aime énormément, des amies comme vous il n'y en a pas.

Enfin, je souhaite dédier ce mémoire à tous les membres de ma famille. Je voudrais tout particulièrement exprimer ma reconnaissance à mes parents, mon papounet Wahib Sekheri et ma mamounet Wahiba Nourine. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je tiens à remercier aussi ma sœur Sarah pour son soutien, Sarah t'es la meilleure sœur au monde. Mon frère Mohamed, sa femme Kenza et leur petite princesse Bouchra je vous aime, et Bouchra sera certainement une grande scientifique. Sans vous ma famille je ne serai rien.

Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté.

(Marie Curie)

Introduction

Les mécanismes qui préservent l'information génétique codée par l'ADN et sa transmission à travers les générations sont l'objet de recherches approfondies depuis la découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick (Watson & Crick, 1953). En effet, l'ADN subit continuellement des lésions dont le nombre peut atteindre un million/par jour/cellule, à cause des produits engendrés par le métabolisme cellulaire telles que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les agents alkylants (Dizdaroglu, 2012). L'ADN est menacé par son instabilité chimique intrinsèque, comme son aptitude à subir une dépurination spontanée, par exemple (An et al., 2014). Les produits chimiques environnementaux et les rayonnements peuvent affecter sa constitution physique (Rastogi, Richa, Kumar, Tyagi, & Sinha, 2010). Au total, les dommages à l'ADN chez les mammifères représentent l'équivalent de 10^4 - 10^5 lésions par cellule et par jour (Swenberg et al., 2011).

Ces dommages peuvent bloquer la réplication et la transcription du génome (Branzei & Foiani, 2010). Ils peuvent aussi générer des lésions simple brin ou des cassures double brin (CDB) qui conduisent à des aberrations chromosomiques (Allen, Ashley, Hromas, & Nickoloff, 2011). Les lésions peuvent diminuer la fidélité de la réplication qui se traduit par une augmentation des mutations. Les mutations et les aberrations chromosomiques peuvent activer les oncogènes ou inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs et augmenter ainsi le risque de cancer (Bartek, Bartkova, & Lukas, 2007). Il est donc primordial que les lésions soient enlevées de manière efficace et en temps opportun. Contrairement à d'autres macromolécules cellulaires, l'ADN

endommagé ne peut pas être remplacé. Son intégrité repose uniquement sur la réparation. Pour lutter contre les menaces qui peuvent l'endommager, les cellules ont développé le mécanisme de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) qui consiste à détecter les lésions, signaler leur présence et finalement promouvoir leur réparation (Ghosal & Chen, 2013).

Les différents types de dommages à l'ADN

L'oxydation de l'ADN

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont les radicaux libres, sont les produits du métabolisme cellulaire normal des organismes aérobiques. Des niveaux plus élevés en ROS sont dus aux rayonnements ionisants et aux ultraviolets (Dizdaroglu, 2015). Les ROS interagissent avec les nucléobases en provoquant un large spectre de dommages très mutagènes et une instabilité génique, s'ils ne sont pas réparés (Dizdaroglu, 2012). La lésion de l'ADN la plus fréquente induite par les ROS est le 8-oxo-guanine (David, O'Shea, & Kundu, 2007). Si celle-ci n'est pas réparée, la machinerie de réplication peut insérer l'Adénine (A) à l'opposé du 8-oxo-G, et convertir de manière permanente la paire (G: C) en une paire (T: A) qui se traduit par une augmentation de la mutagenèse (Berquist & Wilson, 2012). L'accumulation des lésions oxydatives provoque de nombreuses pathologies, y compris la carcinogenèse, la neuro-dégénérescence ainsi que le vieillissement (Berquist & Wilson, 2012). Dans ces conditions, la réparation de l'ADN devient cruciale.

L'alkylation de l'ADN

Les agents alkylants font partie des agents endommageants. Ils proviennent principalement de la fumée de tabac, des carburants et des produits de combustion (Kondo, Takahashi, Ono, & Ohnishi, 2010). Ils peuvent provenir des dommages oxydatifs ou des donneurs cellulaires de méthyle tels que la S-adénosylméthionine (SAM), qui est un cofacteur dans les réactions biochimiques (Sedgwick, Bates, Paik, Jacobs, & Lindahl, 2007). Les agents alkylants interagissent avec les atomes d'azote et d'oxygène des bases de l'ADN, et donnent une variété de produits qui vont de simples groupes méthyle à des additions complexes d'alkyle (Fu, Calvo, & Samson, 2012). L'attaque par ces agents peut conduire à divers types de lésions sur les bases de l'ADN, et la plupart des produits d'addition qui en résultent sont mutagènes et toxiques pour la cellule (Mishina, Duguid, & He, 2006).

La formation des sites abasiques

Les sites abasiques surviennent de la rupture de la liaison N-glycosidique entre la base et le désoxyribose (Lindahl, 1993). Ces sites représentent les lésions les plus fréquentes faites à l'ADN. On estime que dans les conditions physiologiques, il se forme environ 10 000 sites apuriniques et 500 apyrimidiques / par cellule/ jour (Malina, Scott, & Brabec, 2015). Les sites abasiques résultent de l'hydrolyse spontanée des bases ou encore de la réparation des bases endommagées par les enzymes spécialisées (Hinz, Mao, McNeill, & Wilson, 2015). Ces sites conduisent le plus souvent à des cassures simple brin de l'ADN pouvant mener à la mort cellulaire, s'ils ne sont pas réparés (Cavalieri et al., 2012).

Les cassures de l'ADN

Les cassures simple brin (SSBs) sont des discontinuités dans un seul brin de la double hélice de l'ADN, et sont généralement accompagnées par la perte d'un seul nucléotide (Caldecott, 2008). L'une des sources les plus courantes des SSBs est l'attaque de l'ADN par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Caldecott, 2007). Les SSBs peuvent également survenir de l'activité erronée des enzymes cellulaires telles que l'ADN topoisomérase 1 (TOP1) (Caldecott, 2014). La conséquence la plus probable des SSBs non réparées dans les cellules en prolifération est l'effondrement des fourches de réplication de l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire, qui peut conduire à la formation des CDB (Caldecott, 2008).

Les cassures double-brin d'ADN (CDB) sont générées lorsque les liaisons phosphodiester des deux brins d'ADN sont rompues à la même position, ou à proximité suffisante pour permettre la dissociation physique de la double hélice en deux molécules séparées (Aparicio, Baer, & Gautier, 2014). Contrairement aux cassures simple-brin dans lesquelles l'information génétique conservée sur le brin complémentaire est toujours disponible comme matrice pour la réparation, la restauration fidèle des CDB peut être problématique. En plus de la perte de l'information génétique, les CDB peuvent conduire à la fragmentation, la perte ou le réarrangement chromosomique (Hoeijmakers, 2009). Les CDB sont générées par l'action des agents exogènes tels que les rayonnements ionisants (le rayonnement cosmique ou les rayons X) ou par les produits chimiques radiomimétiques (Aparicio et al., 2014). Les médicaments qui génèrent des CDB sont utilisés dans la chimiothérapie du cancer, puisque les cellules tumorales sont généralement plus sensibles que les cellules normales. Les cassures double-brin peuvent

être utilisées par la cellule pour générer la variabilité génétique, lors de la méiose pour la ségrégation réductionnelle des chromosomes et le brassage des allèles, ou lors de la recombinaison V(D)J pour établir le répertoire immunitaire dans toute sa diversité (Mehta & Haber, 2014). Dans ces cas, la production des cassures double-brin est sous le contrôle de la cellule. Les CDB sont rares, mais difficiles à réparer et extrêmement toxiques.

Les pontages intercaténaux

Les pontages intercaténaux de l'ADN (ICL) impliquent une liaison covalente entre les brins d'ADN (Muniandy, Liu, Majumdar, Liu, & Seidman, 2010). Lorsqu'ils ne sont pas réparés, un petit nombre d'ICL peut tuer la cellule puisqu'ils empêchent la séparation des deux brins d'ADN, et par conséquent empêchent aussi les processus cellulaires essentiels, y compris la réplication de l'ADN et la transcription (Clauson, Scharer, & Niedernhofer, 2013). Cette cytotoxicité est largement exploitée par la chimiothérapie qui utilise des agents de réticulation tels que les composés de platine et la mitomycine (Deans & West, 2011).

Les mésappariements des bases

Les erreurs qui se produisent pendant le métabolisme normal de l'ADN, y compris la réplication, la recombinaison et la réparation, représentent une autre source de lésions de l'ADN. L'incorporation d'un nucléotide non complémentaire génère des mésappariements des bases lors de la synthèse d'ADN à des taux variables, en fonction de nombreux facteurs, y compris les ADN polymérases (Curtin, 2012). En général, les ADN polymérases répliquatives ont une grande fidélité de réplication, tandis que les ADN

polymérase translésionnelles qui contournent les sites de dommages à l'ADN notamment, ont une faible fidélité de réplication. S'ils ne sont pas réparés, ils peuvent générer des mutations dans les cellules somatiques ou germinales qui peuvent modifier le phénotype cellulaire et causer un dysfonctionnement cellulaire (G. M. Li, 2008).

Les voies de réparation des dommages à l'ADN

La réparation par excision des bases

Ce système intervient principalement dans la réparation des lésions oxydatives liées au métabolisme cellulaire. Il prend en charge aussi les dommages provoqués par les agents alkylants, les sites apyrimidiniques/ apuriques (AP sites) et les cassures simple-brin (Moor, Vasil'eva, Anarbaev, Antson, & Lavrik, 2015) (Figure 1). L'étape initiale consiste en la reconnaissance de la lésion effectuée par une glycosylase qui va balayer le long de l'ADN à la recherche des bases endommagées (Friedman & Stivers, 2010). Lorsqu'une lésion est trouvée, l'ADN glycosylase clive la liaison N-glycosidique entre la base et le désoxyribose afin d'exciser la base endommagée. Le site AP résultant est traité par une AP endonucléase 1 (APE1) afin de générer une extrémité 3'hydroxyle et une extrémité 5'deoxyribosephosphate (5'-dRP) (Y. J. Kim & Wilson, 2012). Ce site est alors traité par l'ADN polymérase β (Pol β) qui supprime le groupement 5'-dRP, et insère simultanément un nouveau nucléotide dans l'espace de réparation (Hegde, Hazra, & Mitra, 2008). L'interruption simple-brin est définitivement scellée par un complexe d'ADN ligase III α (Lig III) en association avec le cofacteur (XRCC1) (Wallace, Murphy,

& Sweasy, 2012). De manière générale, c'est à travers ce mécanisme (BER) que la majorité des bases endommagées sont réparées.

La réparation des cassures double brin

Les principales voies de réparation des CDB sont définies selon la manière dont l'homologie de séquence est utilisée pour rejoindre les extrémités des cassures double-brin. On parle alors de la Recombinaison Homologue (HR), ou selon la jonction non homologue (NHEJ), qui ne nécessite pas d'homologie de séquence, mais qui est active tout au long du cycle cellulaire constituant la principale voie de réparation des CDB dans les cellules des mammifères (Lieber, 2010) (Figure1). Pour initier la NHEJ, l'hétérodimère Ku70 / 80 (KU) se lie à l'ADN (Shibata & Jeggo, 2014). Les CDB lient KU, puis recrutent et activent la sous-unité catalytique de l'ADN protéine kinase (DNA-PK) qui, à son tour, déclenche une cascade de signalisation étendue, orchestrant ainsi les processus de réparation en aval (Neal & Meek, 2011). La NHEJ est facilitée par les protéines d'échafaudage XRCC4 et XLF qui lient l'ADN ligase 4, l'enzyme responsable du scellement de la cassure (Cottarel et al., 2013; Y. Li et al., 2008). Si les extrémités de l'ADN ont besoin de traitement nucléolytique avant la ligature, l'endonucléase Artemis, une protéine qui interagit avec DNA-PK, offre cette activité (Kakarougkas & Jeggo, 2014).

Contrairement à la NHEJ, la réparation par recombinaison homologue (HR) nécessite l'alignement des séquences homologues des cassures double-brin avant la ligation. Dans les cellules des mammifères, la HR est produite en grande partie au cours de la phase S du cycle cellulaire. Durant la HR, la chromatide sœur répliquée est utilisée comme matrice homologue afin de copier et de rétablir la séquence d'ADN manquante

sur la chromatide endommagée (Shahar et al., 2012). La recherche d'homologie de séquence dans la HR nécessite la présence d'ADN simple brin au niveau des extrémités de la cassure. Cet intermédiaire peut être généré par la dégradation nucléolytique de l'extrémité 5' du brin de la DSB dans le processus de résection de l'ADN (Symington & Gautier, 2011). La résection est initiée par le complexe MRN (MRE11 / RAD50 / NBS1) qui lie directement les extrémités de la cassure. La protéine MRE11 qui abrite une activité endo et exo- nucléasique séparable, génère en 3' des ssDNA par une combinaison de clivage endonucléolytique, suivie d'un traitement exonucléolytique dans le sens 3'-5' (Shibata et al., 2014). Ce processus va permettre le recrutement de la protéine de réplication A (RPA) qui se lie rapidement à la queue de l'ADN simple brin, ce qui empêche la formation de structures secondaires. Par la suite, RPA est déplacée par RAD51 dépendamment de la protéine (BRCA2) (Pellegrini et al., 2002). Le chargement de RAD51 favorise l'invasion et le déplacement du brin endommagé sur le brin en bon état pour générer la jonction de Holliday. La réparation en découle par l'utilisation du brin non endommagé comme matrice, suivie d'une ligature des extrémités d'ADN (Kakaroukias & Jeggo, 2014).

La réparation des pontages intercaténaux

La réparation des ICL se produit durant la phase S du cycle cellulaire (J. Zhang & Walter, 2014). Ce mécanisme nécessite (1) des endonucléases qui reconnaissent et incisent l'ADN endommagé, (2) des ADN polymérase translésionnelles, (3) des recombinaisons et 15 protéines FANCD1 (J. Zhang et al., 2015). La réparation est déclenchée quand une fourche de réplication entre en collision avec l'ICL (Branzei & Foiani, 2010). Cela crée un substrat pour des endonucléases structure-spécifique qui vont décrocher la

lésion, générant une cassure de la double hélice de l'ADN (Patel & Joenje, 2007). À l'opposé de la lésion, la réplication est contournée par les ADN polymérase translésionnelles. Enfin, la fourche est rétablie par recombinaison homologe (Deans & West, 2011).

La réparation des mésappariements des bases

La réparation des mésappariements (MMR) est une voie hautement conservée qui joue un rôle clé dans le maintien de la stabilité génomique. La spécificité de la MMR est principalement la réparation des mésappariements et des insertions / délétions des bases générées au cours de la réplication et de la recombinaison de l'ADN (Guillotini & Martin, 2014). La MMR réduit ainsi de 100 à 1000 fois les erreurs au niveau de l'ADN et les empêche de devenir des mutations au cours de la prolifération cellulaire (Xiao, Melton, & Gourley, 2014). Chez l'homme, la MMR est initiée par la reconnaissance de l'anomalie structurale liée au mésappariement par l'hétérodimère MSH2-MSH6 (MutS α) dans le cas d'une petite insertion ou une délétion, ou bien par l'hétérodimère MSH2-MSH3 (MutS β) dans le cas des grandes boucles (Erie & Weninger, 2014; Xiao et al., 2014). Ce dimère subit un changement de conformation ATP-dépendant pour permettre le recrutement d'un autre hétérodimère MLH1-PMS2, après hydrolyse d'une deuxième molécule d'ATP (Guillotini & Martin, 2014). Ce nouveau complexe est capable de glisser sur l'ADN à distance du mésappariement, et c'est ainsi qu'une endonucléase (EXO1) est recrutée pour dégrader le brin contenant le mésappariement (Guillotini & Martin, 2014). Enfin, les protéines nécessaires à la réplication sont recrutées pour assurer la restauration du brin d'ADN (Iyama & Wilson, 2013).

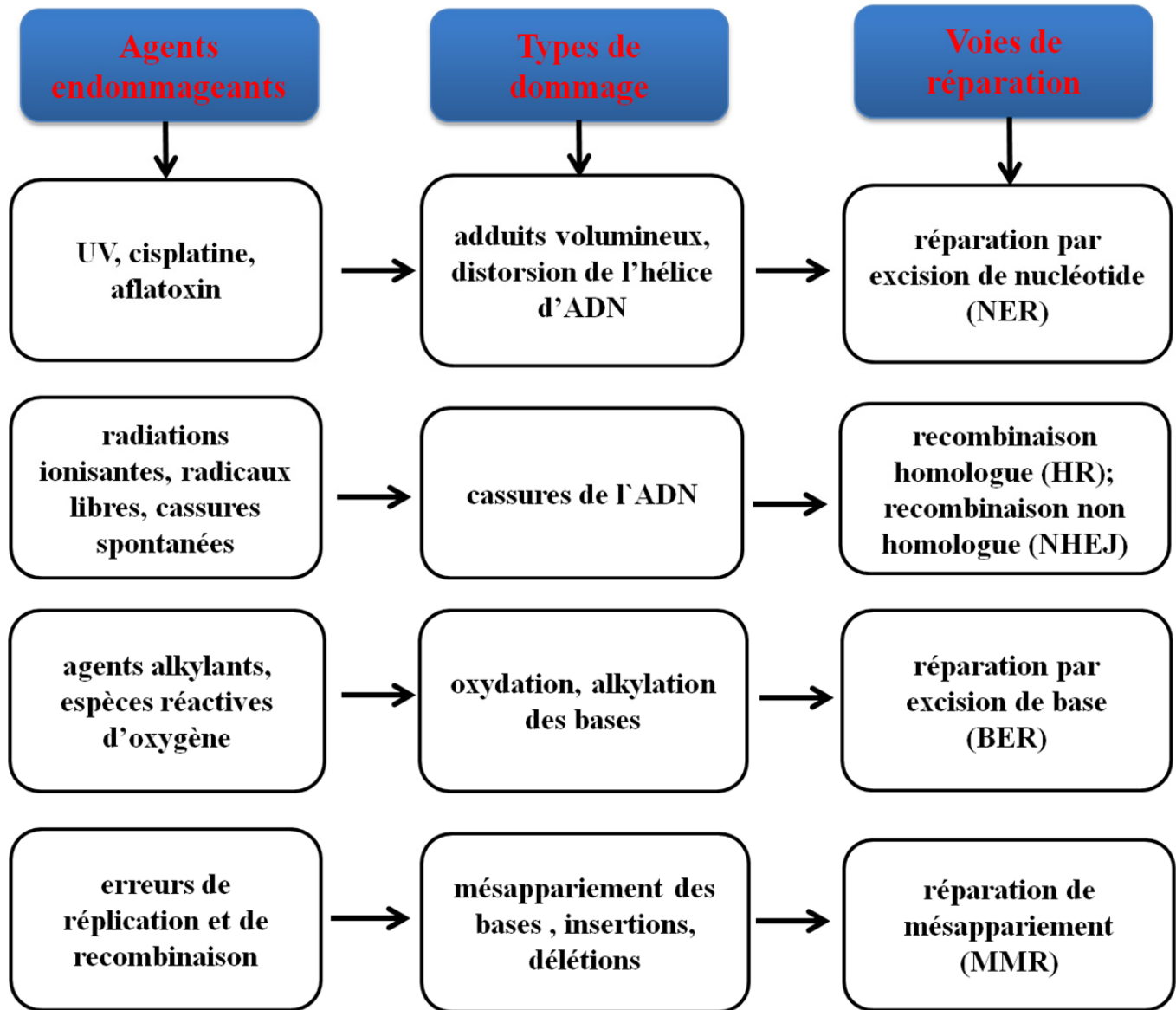


Figure 1: Les différents types de dommages à l'ADN et les voies de réparation correspondantes.

La réponse aux dommages à l'ADN

La réparation des dommages à l'ADN est effectuée par une multitude de protéines, y compris les nucléases, hélicases, polymérases, recombinaisons, ligases et glycosylases. Ces outils de réparation doivent être très bien régulés parce que s'ils sont mal utilisés, ou autorisés à accéder à l'ADN au moment ou à l'endroit inapproprié, ils peuvent menacer son intégrité. Les cellules eucaryotes ont développé la réponse aux dommages à l'ADN (DDR), décrite comme étant le mécanisme cellulaire qui régule le recrutement et l'activation des facteurs de réparation aux sites du dommage. La DDR assure aussi la coordination et le choix des voies à employer, la modulation de la chromatine, et la coordination de la progression du cycle cellulaire pour une réparation efficace de l'ADN (Ciccia & Elledge, 2010). La voie de réponse aux dommages à l'ADN est une voie de transduction du signal comprenant des senseurs, des transducteurs et des effecteurs (Jackson & Bartek, 2009).

La DDR est principalement médiée par des protéines de la famille des *phosphoinositide 3-kinase related kinases* (PIKKs) : ATM, ATR, et DNA-PK et par les membres de la famille des poly (ADP-ribose) polymérase (PARP). ATM et DNA-PK sont activées par des agents comme les radiations ionisantes qui créent des CDB (Harper & Elledge, 2007; Meek, Dang, & Lees-Miller, 2008). Contrairement à ATM qui a des centaines de substrats, DNA-PK régit principalement un petit groupe de protéines impliquées dans la jonction des extrémités des cassures double brin. En ce qui concerne ATR, en complexe avec sa protéine partenaire ATRIP, elle est recrutée au niveau des régions ssDNA revêtues de RPA (Cimprich & Cortez, 2008). Suite à la reconnaissance

des lésions de l'ADN par des protéines senseurs, ATM et ATR phosphorylent initialement des protéines médiatrices qui amplifient la DDR en agissant à titre de recruteurs de substrats d'ATM / ATR. Les protéines effectrices de DDR sont directement phosphorylées par ATM / ATR ou par les kinases Chk 1 et Chk2 (Harper & Elledge, 2007). ATM et ATR sont nécessaires pour la NHEJ, RH, la réparation ICL et la NER.

Pour les cassures double brin, le complexe MRN est rapidement assemblé au site de la cassure où il agit comme un senseur qui va faire appel à ATM (Stracker & Petrini, 2011). Immédiatement après son recrutement aux sites des CDB, ATM contribue à la phosphorylation de la variante d'histone H2AX sur la sérine 139 (γ H2AX). La phosphorylation de H2AX déclenche une cascade qui assemble les composants de la DDR au niveau du site du dommage (Scully & Xie, 2013). Le complexe MRN module l'activité d'ATM et active ses cibles en aval. Ceci suggère qu'ATM et MRN travaillent ensemble sur les sites des CDB de l'ADN, afin d'affiner le recrutement et la dissociation des facteurs de la DDR, pour une réparation efficace des dommages. ATM joue un rôle essentiel dans l'activation du point de contrôle G1/S, ce qui empêche les cellules avec un ADN endommagé d'entrer en phase S. Cette réponse est principalement médiée par le suppresseur de tumeur p53, qui est l'une des premières cibles d'ATM. En réponse à une CDB, ATM phosphoryle directement p53 sur la sérine 15 (Weber & Ryan, 2015). Cette phosphorylation de p53 conduit à sa stabilisation en empêchant son ubiquitination qui médie sa dégradation par Mdm2 (Marine & Lozano, 2010). Lors de l'activation et de l'accumulation dans le noyau, p53 entraîne l'expression des gènes impliqués dans l'activation du point de contrôle tel que p21, mais également de plusieurs gènes qui sont

impliqués dans l'induction de l'apoptose (Sullivan, Gallant-Behm, Henry, Fraikin, & Espinosa, 2012).

Comme ATM, ATR est l'une des kinases centrales impliquées dans la DDR. ATR est activée par des structures d'ADN simple brin qui peuvent survenir lors d'une résection due à une CDB de l'ADN, ou dans les fourches de réplifications bloquées. Lorsque les ADN polymérase sont bloqués lors de la réplication, les hélicases réplcatives continuent à ouvrir l'ADN en avant de la fourche de réplication, conduisant à la production de longs tronçons d'ADN simple brin (ssDNA), qui sont ensuite liés par la protéine de liaison RPA. Le recrutement des complexes ATR / ATRIP à ces sites de stress réplcatif et de dommages à l'ADN est régulé par une interaction directe d'ATRIP avec RPA lié à ssDNA (Errico & Costanzo, 2012). Une fois activée, ATR agit par l'intermédiaire de ses cibles en aval afin de promouvoir la réparation de l'ADN, l'arrêt transitoire du cycle cellulaire, et enfin la stabilisation et le redémarrage des fourches de réplication bloquées. Plusieurs de ces fonctions sont médiées par la cible principale d'ATR, Chk1. ATR joue un rôle important dans l'activation du point de contrôle intra-S-phase au cours de la progression de la phase S normale et de la réponse aux dommages à l'ADN (Errico & Costanzo, 2012). Chk1 phosphoryle Cdc25A, ce qui mène à sa dégradation. Ceci empêche l'activation des kinases cycline-dépendantes 2 (Cdk2) / cyclines E/A et conduit à un arrêt du cycle cellulaire (Busino, Chiesa, Draetta, & Donzelli, 2004). ATR joue aussi le rôle de médiateur principal du point de contrôle G2 / M pour empêcher l'entrée prématurée en mitose des cellules avant que la réplication de l'ADN ne soit terminée, ou en présence de dommages. L'arrêt du cycle cellulaire en G2 / M par ATR est principalement médié par deux mécanismes: (i) la dégradation de Cdc25A et (ii) la

phosphorylation de la phosphatase Cdc25C sur la serine 216 par Chk 1. Ceci crée un site de liaison à la protéine 14-3-3 qui se lie à Cdc25C, et facilite son exportation à partir du noyau ainsi que sa séquestration cytoplasmique. La relocalisation cytoplasmique de Cdc25C empêche les kinases cycline-dépendantes 1 (Cdk1) / cyclines B d'être déphosphorylées ce qui inhibe l'entrée en mitose (Kasahara et al., 2010).

Bien qu'ATM et ATR soient activées par différents types de dommages à l'ADN et agissent dans des voies distinctes, leurs cibles en aval se chevauchent partiellement tel que p53 et la variante de l'histone H2AX qui sont communes aux deux kinases. Et c'est grâce à ces cibles en aval qu'elles coopèrent dans la médiation des réponses cellulaires aux nombreux stress génotoxiques, et maintiennent la stabilité génomique en coordonnant la progression du cycle cellulaire à la réparation de l'ADN (Weber & Ryan, 2015).

La synthèse translésionnelle

La machine de réplication de l'ADN est finement régulée pour répliquer l'ADN avec une très grande efficacité et une étonnante fidélité. Cependant, elle est facilement perturbée par les dommages à l'ADN. Malgré la grande variété des mécanismes de réparation, la machine de réplication peut rencontrer des lésions sur l'ADN au cours de chaque cycle cellulaire. Le site catalytique des ADN polymérase répliquatives étant intolérant aux lésions de l'ADN, celui-ci n'est plus synthétisé. La cellule qui ne peut plus répliquer l'ADN endommagé avant la mitose, adopte la solution de tolérance aux dommages à l'ADN.

Au cours de la tolérance aux dommages, la synthèse de l'ADN se fait par des ADN polymérase appartenant pour la plupart à la famille des polymérase Y. Ce mécanisme est appelé synthèse translesionnelle (TLS) (Chang & Cimprich, 2009). Cependant, cette tolérance s'accompagne d'une mutagenèse pouvant avoir des conséquences délétères. Il est donc crucial de réguler l'activité des polymérase Y pour éviter qu'elles ne soient employées de manière inappropriée.

Les étapes de base de la TLS impliquent que la polymérase répliquative bloquée soit déplacée et remplacée par une polymérase de la TLS qui insère des bases à l'opposé de la lésion. En effet, le changement de polymérase s'initierait par la mono-ubiquitination de PCNA en K164 par l'ubiquitine ligase RNF8 avec l'aide de l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 UbcH5c (Andersen, Xu, & Xiao, 2008; S. Zhang et al., 2008). PCNA ubiquitinée permet une interaction physique directe entre cette protéine et les polymérase de la TLS, alors qu'une telle interaction n'est pas détectable lorsque PCNA n'est pas ubiquitinée (Chen, Bozza, & Zhuang, 2011). L'élongation à partir de la base incorporée est effectuée par la même polymérase ou par une autre polymérase de la TLS. Enfin, lorsque l'appariement des bases est restauré au-delà de la lésion, la polymérase répliquative reprend le contrôle (Chang & Cimprich, 2009; Sale, Lehmann, & Woodgate, 2012). C'est la TLS qui est responsable des mutations par substitution induites par les dommages à l'ADN. Son pouvoir mutagène est contrôlé à plusieurs niveaux, y compris la régulation du recrutement des polymérase de la TLS à la chromatine, par leur activité de distribution intrinsèque et, éventuellement, par la relecture en *trans* fournie par les polymérase répliquatives (Avkin et al., 2006).

La plupart des dommages qui affectent l'ADN, les conséquences biologiques qui en découlent et les voies de signalisation et de réparation utilisées pour préserver l'intégrité génomique ont été présentés. Les dommages à l'ADN par les UV et le Cisplatine vont suivre.

Les dommages à l'ADN induits par les UV

Les rayons ultraviolets sont des agents exogènes très cancérigènes qui peuvent interagir avec l'ADN et altérer l'intégrité du génome (Rastogi et al., 2010). Le rayonnement UV représente 8% du spectre solaire et est subdivisé en trois types selon la longueur d'onde : les UVA (320 à 400 nm), UVB (280-320 nm) et les UVC (200 à 280 nm) (Cortat et al., 2013). Les UVC et la plupart des UVB sont bloqués par la couche d'ozone, et seulement les UVA et une partie minime des UVB atteignent la surface de la terre. Bien que la couche d'ozone absorbe la partie la plus dangereuse du spectre solaire ultraviolet (UVC), les ultraviolets A et UVB résiduels peuvent induire 100.000 lésions par cellule en une journée (Hoeijmakers, 2009).

La première étape de l'induction des lésions par les UV est l'absorption des photons UV, soit par un chromophore cellulaire (voie directe) ou par un photosensibilisateur (voie indirecte) (Ravanat, Douki, & Cadet, 2001). L'absorption de l'énergie des photons UV modifie la distribution des électrons dans la molécule du photosensibilisateur et crée un état singulet excité. Les dommages cellulaires causés par une molécule excitée peuvent se produire soit par interaction directe avec les molécules

d'ADN et conduire à la formation de radicaux libres, ou par transfert d'énergie vers l'oxygène moléculaire et produire les espèces réactives d'oxygène (ROS). Cette voie indirecte est particulièrement utilisée par les UVA (Greinert et al., 2012). Les UVA ont une faible efficacité dans l'induction des dommages à l'ADN, car ils ne sont pas absorbés par celui-ci. Les effets génotoxiques des UVA ont été principalement attribués à l'induction de stress oxydatif, notamment la production du 8-OxoG (Batista, Kaina, Meneghini, & Menck, 2009) qui peut conduire à la création de sites abasiques ou à des cassures simple-brin (SSBs) (Greinert et al., 2012).

Le pic d'absorption de l'ADN pour les UVC est 260 nm. L'ADN est le principal chromophore cellulaire. Les lampes au mercure germicide basse pression qui émettent des UVC quasi-monochromatique (254 nm) représentent le pilier des études effectuées sur les dommages à l'ADN et la réparation (Mitchell, 2006). L'absorption des UVC et des UVB par l'ADN conduit à la production de photo-produits dans les bases pyrimidiques adjacentes, les plus courants étant les dimères de cyclobutyl pyrimidiques (CPDs) et les (6-4) photoproduits pyrimidine-pyrimidone (6-4PPs) (Rastogi et al., 2010).

Les CPDs résultent de la liaison covalente entre deux pyrimidines adjacentes par formation d'un élément de structure cyclique provenant de la saturation de la double liaison 5-6 pyrimidines; alors que les 6-4 PP proviennent de la liaison entre le C6 de la pyrimidine en 5' et le C4 de la pyrimidine adjacente en 3' (de Lima-Bessa et al., 2008). Le ratio de formation entre CPD et 6-4 PP après irradiation aux UVC est d'environ 3: 1 respectivement. Les 6-4PPs ainsi que les CPDs induisent une déformation de la double hélice de l'ADN. En effet, les 6-4PPs induisent une courbure importante estimée à 44°, contre 30° pour les CPDs (J. K. Kim & Choi, 1995). La présence de ces lésions au niveau

de la double hélice d'ADN constitue une obstruction physique à la fois pour la réplication et la transcription. Les photoproduits dans la molécule d'ADN sont la cause principale de la mort cellulaire par apoptose après irradiation aux UV (Batista et al., 2009).

Les ROS ainsi que les photoproduits induits par les UV peuvent causer des cassures simples ou double brin au niveau de L'ADN. Il est supposé que les photoproduits initiaux se convertissent en CDB lors de la réplication de l'ADN, en raison de l'effondrement des fourches de réplication. Une quantité très faible de CDB a été trouvée dans la cellule où la réplication a été inhibée (Dunkern & Kaina, 2002). Les UV induisent aussi des types spécifiques de mutations: la cytosine (C) est substituée par la thymine (T) sur les sites de dipyrimidine et la substitution des bases en tandem CC → TT se produit rarement. Ces deux types de mutation sont aussi appelés "la signature des UV". Leur détection suggère une exposition antérieure aux UV (Brash, 2015). L'un des mécanismes de formation de ces mutations spécifiques aux UV est la désamination des cytosines dans un CPD (Tessman, Liu, & Kennedy, 1992).

Les dommages à l'ADN par le Cisplatine

Le cisplatine ou cis-diaminedichloroplatine (II) (CDDP) est l'un des médicaments les plus couramment utilisés pour traiter un large spectre de cancers (Kelland, 2007). L'ADN est considéré comme la cible biologique primaire du cisplatine (Jung & Lippard, 2007). L'atome de platine fait des liaisons covalentes avec l'azote en position 7 (N7) des bases purines pour former des réticulations 1,2- ou 1,3-intra-brin (Ummat et al., 2012) et des réticulations inter-brins qui sont des lésions mineures, mais hautement cytotoxiques.

La réticulation intra-brin entre deux résidus adjacents de guanine est considérée comme la lésion responsable de la cytotoxicité du cisplatine. Ces lésions vont interférer avec la réplication de l'ADN et la transcription et conduire à la mort cellulaire (Kelland, 2007).

La réparation par excision des nucléotides

La réparation par excision des nucléotides (NER) est la principale voie utilisée par la cellule pour réparer les lésions volumineuses de l'ADN causées par les UV, les mutagènes environnementaux et certains produits de la chimiothérapie, notamment le cisplatine. Comparativement aux autres voies de réparation de l'ADN, La NER est capable d'éliminer un grand nombre de lésions, y compris les dimères de cyclobutyl-pyrimidique (CPDs) et les 6-4 pyrimidine-pyrimidone (6-4PPs), principales lésions induites par les rayons ultraviolets (UV), et les liaisons intracaténaïres dues aux médicaments tels que le cisplatine. La NER est utilisée pour la réparation de toute lésion volumineuse provoquant une distorsion de l'hélice de l'ADN. Cette polyvalence de la NER repose sur sa capacité de contourner la reconnaissance de la lésion et de se concentrer plutôt sur un ensemble de points communs partagés par beaucoup de lésions différentes (Marteijn, Lans, Vermeulen, & Hoeijmakers, 2014). La NER reconnaît et élimine les distorsions hélicoïdales à travers deux voies distinctes: le génome (réparation globale du génome, GG-NER), et le brin transcrit des gènes actifs (réparation couplée à la transcription, TCR-NER) (Kamileri, Karakasilioti, & Garinis, 2012). Les deux voies diffèrent dans la reconnaissance des lésions. La GG-NER est spécifiquement initiée par deux complexes hétérodimériques : UV-DDB et XPC RAD23, alors que la TC-NER est

initiée par le blocage de l'ARN polymérase II au niveau des lésions de l'ADN, ce qui déclenche le recrutement des facteurs de la TC-NER (Dijk, Typas, Mullenders, & Pines, 2014). Après la reconnaissance du dommage, les deux voies convergent vers un mécanisme moléculaire commun qui implique l'ouverture de la double hélice d'ADN, la vérification de la lésion, la double incision suivie par une resynthèse et enfin la ligature du fragment d'ADN néo-synthétisé (Dijk et al., 2014).

Dans la GG-NER, le complexe UV-DDB est considéré comme le facteur initial qui lie l'ADN endommagé (Jeppesen, Bohr, & Stevnsner, 2011). L'hétérodimère UV-DDB (DDB1 et DDB2) fait partie du complexe d'ubiquitine ligase E3 qui contient plusieurs sous-unités (van Cuijk, Vermeulen, & Marteijn, 2014), notamment la protéine d'échafaudage CUL4 et la sous-unité E2 ROC1 (El-Mahdy et al., 2006). DDB1 est la sous-unité de l'adaptateur qui interagit avec d'autres protéines par leurs séquences WD40 qui servent de récepteurs de substrat. DDB2 est l'une des meilleures cibles caractérisées de ce complexe d'ubiquitine ligase (CRL4). L'activité ubiquitine ligase de CRL4-DDB2 est étroitement régulée par le signalosome COP9 (CSN), constitué de plusieurs sous-unités protéolytiques. En absence de stress, CSN s'associe avec le complexe CRL4-DDB2, et inhibe son activité en supprimant la protéine analogue à l'ubiquitine à partir de Nedd8 CUL4 (Groisman et al., 2003). Après irradiation aux UV, CSN se dissocie du complexe CRL4-DDB2, stimule la neddylation de CUL4 et active E3 ligase. Plusieurs substrats CRL4-DDB2, dont DDB2 elle-même, conduisent à sa dégradation par le protéasome (Matsuda et al., 2005). L'ubiquitination de DDB2 permet la réduction de l'affinité de liaison du complexe de l'ubiquitine E3 avec l'ADN endommagé (Sugasawa et al., 2005) et le recrutement de XPC pour la reconnaissance des distorsions volumineuses

dans la structure de l'ADN (Figure2). XPC agit avec d'autres partenaires accessoires ayant diverses fonctions, en particulier HR23B qui facilite la reconnaissance de la lésion par XPC, mais qui ne participe pas aux processus de réparation de l'ADN en aval (Bergink et al., 2012). CEN2 est un facteur facultatif qui peut en coopération avec HR23B, stabiliser XPC ce qui stimule la NER *in vitro* (Araki et al., 2001). XPC est également une cible bien décrite du complexe CRL4-DDB2 qui peut former des chaînes d'ubiquitines K48 liées sur XPC (van Cuijk et al., 2015). Contrairement à DDB2, l'ubiquitination de XPC n'entraîne pas sa dégradation (Fischer et al., 2011; Hannah & Zhou, 2009). La dégradation de XPC ubiquitinée pourrait être inhibée par son interaction avec RAD23 (Marteijn et al., 2014).

Une fois que le dommage est reconnu, XPC lie le facteur de réparation / de transcription TFIIH qui facilite son interaction avec l'ADN lésé (Figure2). Ce facteur se compose de dix sous-unités, dont sept constituent le noyau du complexe (XPD, XPB, p62, p52, p44, p34 et p8/TTDA). Les trois autres sous-unités (CDK7, MAT1 et la cycline H) forment le sous-complexe des cyclines qui est relié au noyau TFIIH par l'intermédiaire d'une interaction avec XPD (Bedez et al., 2013). XPB et XPD sont des hélicases qui déroulent l'hélice à proximité de la lésion dans les sens 5'-3' et 3'-5' respectivement (Fuss & Tainer, 2011). Après les dommages à l'ADN, p8 / TTDA forme une liaison plus stable avec TFIIH et favorise son ouverture autour de la lésion par stimulation de l'activité ATPase de XPB (Stefanini, Botta, Lanzafame, & Orioli, 2010). Ce processus de déroulement sépare les deux hélices d'ADN et génère simultanément deux courts fragments d'ADN simple brin. Ces fragments d'ADN facilitent le recrutement d'un nouveau complexe composé par XPA ayant une affinité pour l'ADN endommagé, et la

protéine RPA qui lie le brin non endommagé. La fonction fondamentale de ce complexe de pré-incision (XPA-RPA) est de stabiliser la structure ouverte de l'ADN (Missura et al., 2001).

Le clivage endonucléolytique et l'excision du brin d'ADN endommagé constituent la seconde étape du processus qui met en jeu deux endonucléases : l'hétéro-dimère XPF-ERCC1 qui incise l'extrémité 5' du ssDNA et le facteur XPG qui incise l'extrémité 3' (Staresinic et al., 2009). Il en découle l'élimination d'un fragment d'ADN comprenant typiquement 27 à 30 nucléotides (Figure 2).

L'espace créé se remplit *de novo* ADN synthétisé par des complexes d'ADN polymérase comprenant DNA Pol δ , DNA Pol ϵ ou bien DNA Pol κ . Ces enzymes sont recrutées par le facteur PCNA en association avec RFC (Ogi et al., 2010).

L'étape finale est la ligation de l'ADN où deux enzymes entre en jeu : la DNA ligase I qui opère exclusivement au cours de la phase S du cycle cellulaire, et le complexe DNA-ligase III α -XRCC1 qui fonctionne pendant toutes les phases du cycle cellulaire (Moser et al., 2007).

La TC-NER s'occupe de la réparation des lésions qui bloquent l'ARN polymérase et interfèrent avec le processus vital de la transcription. Cette TC-NER diffère de la GG-NER dans la reconnaissance du dommage (Figure 2) réalisé dans la TC-NER par l'ARN polymérase II (Laine & Egly, 2006). Ici, deux protéines : la CSA et la CSB facilitent l'accès à la lésion des facteurs de la NER. La CSA forme un complexe ubiquitine E3 avec DDB1-CUL4-ROC1 (CRL4-CSA). Le complexe de CRL4-DDB2 est nécessaire à la GG-NER, le complexe CRL4-CSA à la TC-NER, et la CSN à l'ubiquitine ligase de CRL4-CSA (Groisman et al., 2003). Il a été démontré que la dégradation de CSB

polyubiquitinée se fait 3 h après UV, ce qui coïncide avec la dissociation de CSN et CRL4-CSA. Cette dégradation de CSB médiée par CSA ne se produit qu'une fois la réparation terminée (Groisman et al., 2006). L'une des fonctions clés de UVSSA pendant la TC-NER est de recruter la DUB USP7 (Nicholson & Suresh Kumar, 2011) qui permet la de-ubiquitination de CSB afin d'assembler les complexes de TC-NER avant que CSB ne soit dégradée. Au cours de la NER, l'ubiquitination n'est pas seulement importante à la régulation des interactions protéine-protéine pour faciliter la transition à travers les différentes étapes de la NER. Elle semble fonctionner aussi dans l'élimination des facteurs de réparation de la chromatine lorsque leur activité n'est plus requise, ou quand la réparation échoue. De plus, l'initiation de la NER doit être soigneusement régulée pour éviter une excision sur l'ADN non endommagé (van Cuijk et al., 2014). Au cours de la TC-NER, l'ARN polymérase II est aussi ubiquitinée au niveau de la K48 par l'Elongin ABC-CUL5-RBX2 entraînant sa dégradation par le protéasome (Harreman et al., 2009) afin de permettre le recrutement de XPG et TFIIH, après quoi le reste de la réaction de TC-NER peut procéder comme pour la GG-NER (Laine & Egly, 2006).

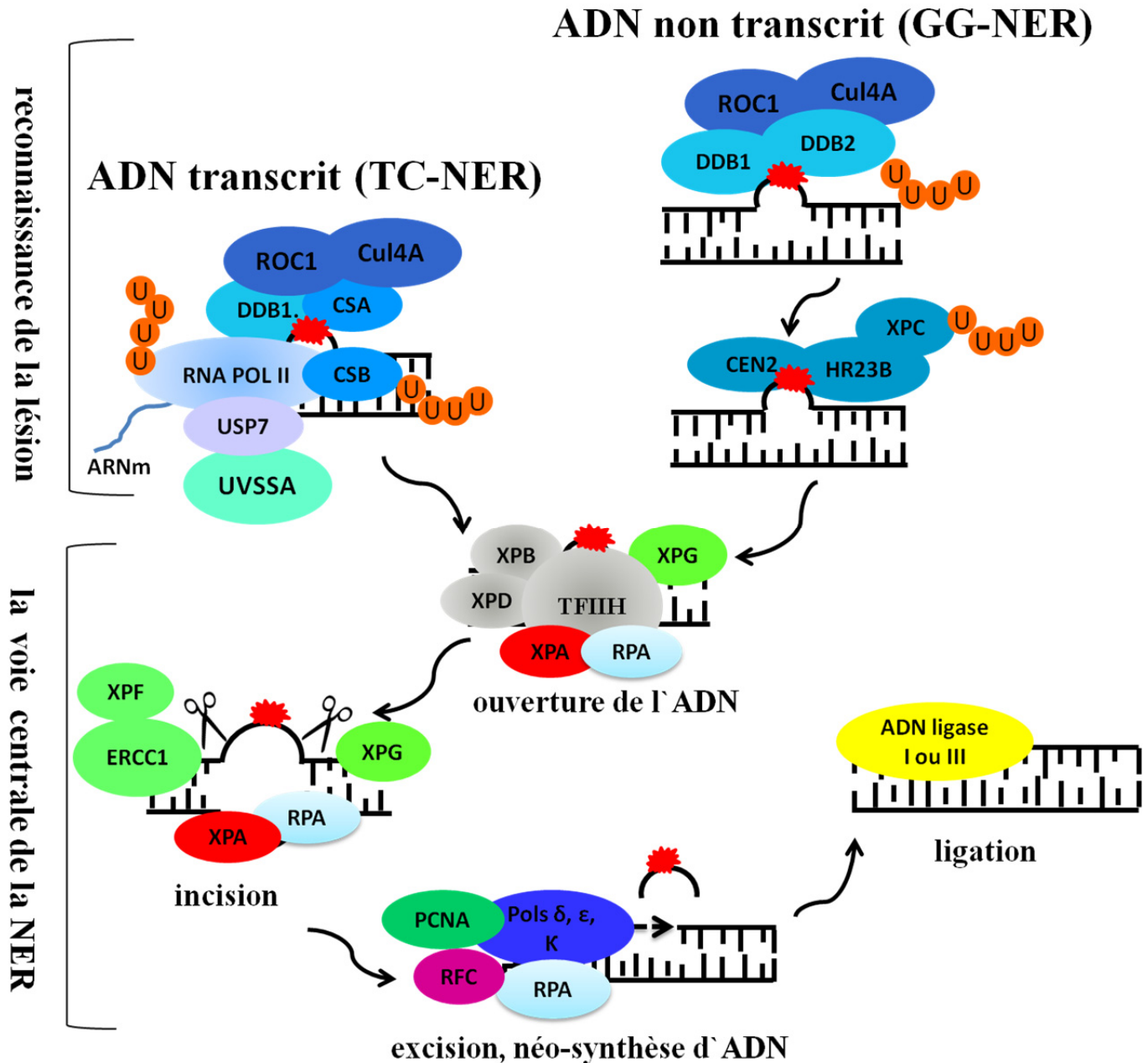


Figure 2 : Mécanismes de la réparation de l'ADN par excision des nucléotides.

La réparation par excision des nucléotides (NER) permet l'élimination des lésions qui provoquent une distorsion de la double hélice de l'ADN. De façon globale, le mécanisme de la réparation par excision de nucléotides se décompose en quatre étapes: (1) Reconnaissance de la lésion par le complexe UV-DDB dans le cas de la GG-NER, et par l'ARN polymérase II bloquée au site de la lésion dans le cas de la TC-NER (2) Ouverture de la double hélice de l'ADN et vérification de la lésion par l'action coordonnée des protéines XPD, XPB, XPA, et RPA (3) Incision du fragment de nucléotides portant la lésion par les endonucléases XPG et ERCC1-XPF (4) Excision de ce fragment simple brin (30 bp) et synthèse d'un nouveau à partir du brin complémentaire intact (5) La ligature du nouveau fragment synthétisé par la ligase I ou III.

Activation d'ATR après dommage à l'ADN par les UV

Chez tous les eucaryotes, l'ADN simple brin qui est induit par une lésion est d'abord détecté par la protéine de réplication A (RPA) (Fanning, Klimovich, & Nager, 2006), qui est un complexe de protéines de liaison au ssDNA. Ensuite, la protéine interagissant avec ATR (ATRIP), se lie directement à RPA qui revêt l'ADN simple brin (Cortez, Guntuku, Qin, & Elledge, 2001) et permet ainsi la formation du complexe ATR-ATRIP pour localiser les sites de dommages à l'ADN (Shiotani & Zou, 2009).

Le blocage des fourches de réplication causé par les photoproduits des UV durant la phase S va permettre la création de longues séquences d'ADN simple brin revêtues de la protéine de réplication A (RPA). Le complexe RPA-ssDNA va recruter ATRIP qui va activer la signalisation ATR au niveau du site du dommage (Bartek & Lukas, 2007; Nam & Cortez, 2011). La NER reconnaît et traite les dommages induits par les UV en effectuant une double incision avec les endonucléases XPG et ERCC1-XPF. Il en résulte une région de ssDNA de 22-35 nucléotides revêtus de RPA et constituant un substrat potentiel pour déclencher l'activation d'ATR; ce qui va fortement augmenter la signalisation induite par les dommages (Marteijn et al., 2014).

Lors de son activation, ATR coordonne les points de contrôle du cycle cellulaire, la stabilité des fourches de réplication et leur redémarrage. Cependant, peu d'études ont pu élucider les mécanismes spécifiques à travers lesquels ATR provoque ces réponses. Les mécanismes les mieux caractérisés sont les réponses médiées par l'activation de Chk1. Ils comprennent le point de contrôle en phase S et G2 qui empêche l'entrée en mitose en présence d'ADN endommagé, par la régulation de la phosphatase CDC25

(Cimprich & Cortez, 2008) (Stracker, Usui, & Petrini, 2009). La modification de la chromatine la plus abondante associée à une activation d'ATR est la phosphorylation du variant d'histone H2AX (γ H2AX) (Hanasoge & Ljungman, 2007). γ H2AX permet de recruter de nombreux facteurs de la DDR au voisinage des lésions afin d'accélérer la réparation, et d'introduire et maintenir la signalisation.

Les maladies liées à une déficience au niveau de la NER

Des défauts dans le maintien de l'intégrité du génome, notamment dans la réparation par excision des nucléotides (NER), provoquent des pathologies associées soit à une prédisposition élevée au cancer de la peau et/ou à de graves anomalies du développement neurologique (Sepe, Payan-Gomez, Milanese, Hoeijmakers, & Mastroberardino, 2013). Et des défauts dans la NER conduisent à des maladies autosomiques héréditaires telles que la xérodémie pigmentaire (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et le syndrome de sensibilité aux UV^S et la triochothiodystrophie (TTD) (Niedernhofer, Bohr, Sander, & Kraemer, 2011).

La xérodémie pigmentaire

Chez les patients XP, huit groupes de complémentation ont été découverts : les sept premiers (XP-A à XP-G) (Tableau 2) sont défectueux exclusivement au niveau de GG-NER (XP-C et XP-E), ou bien dans les deux voies la GG-NER et la TC-NER (XP-B, XP-D, XP-A, XP-G et XP-F) (Feldes & Bonatto, 2015). Le dernier groupe (XP-V) est défectueux au niveau de l'ADN polymérase η (Pol η), de la famille des polymérases

translésionnelles Y, qui synthétisent l'ADN à l'opposé d'une lésion (Lagerwerf, Vrouwe, Overmeer, Fousteri, & Mullenders, 2011). La XP se caractérise par une hypersensibilité aux UV associée à de nombreuses anomalies de la peau (vieillessement de la peau, hyperpigmentation et taches de rousseur) et une très forte prédisposition au développement des cancers de la peau, y compris les carcinomes et les mélanomes malins, avec respectivement une fréquence de 10 000 à 20 000 fois supérieure à la population générale (DiGiovanna & Kraemer, 2012). Outre les anomalies de la peau, une proportion des patients XP (20% à 30%) ont des anomalies neurologiques (Bradford et al., 2011) qui provoquent une surdité neurosensorielle, une ataxie, une microcéphalie ou une déficience intellectuelle (Hosseini, Ezzedine, Taieb, & Rezvani, 2015). Les patients du groupe XP-C et XP-E sont les seuls qui ne présentent aucune forme d'anomalies neurologiques, mais ils ont une forte prédisposition au développement des cancers de la peau. Le groupe XP-A est le plus fréquent après le groupe XP-C (Soufir et al., 2010), et les patients XP-A présentent les symptômes les plus sévères en combinant cancer de la peau et haut risque de dégénérescence neurologique. Les patients XP-B et XP-D sont peu nombreux, mais ils ont des anomalies neurologiques très graves.

Le syndrome de cockayne

Les caractéristiques cliniques du CS n'ont pas grand-chose en commun avec XP (Tableau 2). Les patients CS ont de nombreux défauts de développement, y compris un grave retard physique et mental, une microcéphalie et de la rétinopathie pigmentaire (Gitiaux et al., 2015). La sensibilité aux UV se manifeste par une sévère éruption cutanée, mais sans développement de cancers de la peau, comme c'est le cas chez les patients XP. En général, les caractéristiques cliniques apparaissent dans les premières années de la vie,

mais dans les cas les plus graves, ces symptômes se manifestent à la naissance (Laugel, 2013). Le CS est cliniquement hétérogène. Le test de diagnostic cellulaire chez les patients CS révèle un échec de la synthèse d'ARN après irradiation aux UV (Mayne & Lehmann, 1982). Deux gènes majeurs CSB et CSA sont responsables de la maladie (Laugel et al., 2010).

Le syndrome de sensibilité aux UV (UV^{SS})

Le syndrome de sensibilité aux UV (UV^{SS}) est caractérisé par une légère photosensibilité dans les zones de la peau exposées au soleil, avec des taches de rousseur et de la télangiectasie (Tableau 2). En fait, contrairement aux patients XP, les individus UV^{SS} manifestent seulement une hypersensibilité aux UV sans aucune anomalie neurologique et sans aucune prédisposition au cancer de la peau (Nospikel, 2009). Le UV^{SS} comprend trois groupes de complémentation définis par des mutations spécifiques dans les gènes UVSSA, CSA et CSB (Schwertman, Vermeulen, & Marteiijn, 2013). Ainsi, une importante question reste posée: comment des défauts dans la même voie TC-NER et des mutations dans les mêmes gènes conduisent-ils à des pathologies (UV^{SS}/CS) différentes ?

La trichothiodystrophie

Le syndrome humain de Trichothiodystrophie (TTD) est un trouble autosomique récessif très rare qui se caractérise par une faible teneur en protéines riches en soufre dans les cheveux et les ongles (Stefanini et al., 2010). Le terme grec Trichothiodystrophie (tricho-thio-dys-trophe :cheveux-soufre-défectueux-alimentation) a été utilisé pour décrire ce groupe de patients dont les cheveux et les ongles cassants ont une faible teneur

en soufre (Stefanini et al., 2010). Les manifestations et la gravité des symptômes cliniques observés chez les patients TTD sont très variables et affichent un large spectre de phénotypes, y compris une photosensibilité, des ongles et des cheveux cassants, une déficience intellectuelle et une diminution de la fertilité avec une petite taille (Faghri, Tamura, Kraemer, & Digiovanna, 2008). Comme pour le CS, les patients atteints de trichothiodystrophie ont une sensibilité accrue aux ultraviolets, mais ne montrent ni malignité ni augmentation de la pigmentation (Shabbir, 2015). Les dysfonctionnements neurologiques chez ces patients semblent provenir des altérations dans le développement et la maturation du système nerveux et non pas des dommages d'un système déjà formé (Kraemer et al., 2007). Jusqu'ici, trois gènes responsables du phénotype TTD ont été identifiés : XPB, XPD et TTDA. Des mutations dans les sous-unités XPB et XPD du complexe TFIIH induisent un large spectre de symptômes cliniques, y compris XP, CS et TTD (Tableau 2); alors que des mutations dans la sous-unité TTDA ne sont associées qu'à des symptômes TTD (Theil, Hoeijmakers, & Vermeulen, 2014).

Les syndromes combinés

Une évaluation minutieuse et précise des caractéristiques cliniques de chaque syndrome a conduit à l'identification de sous-ensembles de patients chez lesquels les caractéristiques de XP / CS sont combinées (Hosseini et al., 2015). En fait, des mutations dans certains facteurs de la NER conduisent à la combinaison de troubles caractéristiques de deux syndromes distincts. Par exemple, des mutations dans le gène XPD sont impliqués dans XP ou TTD ainsi que dans les syndromes combinés, y compris XP / CS. De même, des mutations dans XPB, XPG et CSB peuvent entraîner des caractéristiques combinées de XP et CS (XP /CS) (DiGiovanna & Kraemer, 2012).

Tableau 2 : Caractéristiques des différents syndromes de la NER.

	XP	CS	UVSS	TTD
Gènes mutés	XP- A,B,C,D,E,F, G,	CS-A, B	CS-A, B, UVSSA	XP-B, D, TTDA
Cancer de la peau	+	-	-	-
Anomalies neurologiques	+/-	+	-	+
Vieillessement accéléré	+/-	+	-	+
Cheveux et ongles cassants	-	-	-	+
GG-NER déficiente	+	-	-	+/-
TC-NER déficiente	+/-	+	+	+/-
Déficiences de la transcription	-	+	-	+

Problématique de recherche

Des mutations dans les gènes impliqués dans la NER génèrent des phénotypes qui vont du développement normal avec forte prédisposition au cancer à des défauts associés aux anomalies de développement neurologique. Cette hétérogénéité phénotypique est difficile à expliquer, néanmoins des études ont montré que l'existence de défauts dans la GG-NER provoquent une accumulation de lésions dans l'ensemble du génome. Ces lésions sont prises en charge par les ADN polymérases translésionnelles, elles-mêmes sujettes à erreur. Donc, la dérivation des lésions par synthèse translésionnelle favorise la survie cellulaire et augmente la mutagenèse, d'où une prédisposition au cancer plus élevée. C'est précisément ce qui est observé chez les patients atteints de xérodémie pigmentaire groupe C (XP-C) et XP-E avec défauts de la GG-NER. Les patients atteints de ce syndrome ne sont que légèrement sensibles aux rayons UV, mais ils possèdent la plus forte incidence de cancer comparativement aux autres groupes de complémentation. Leur susceptibilité de développer un cancer de la peau est augmentée de plus de 1000 fois (DiGiovanna & Kraemer, 2012). Mais comment expliquer la complexité des phénotypes de CS et TTD? Initialement considéré comme un défaut dans la TC-NER. Les caractéristiques cliniques des patients atteints de CS sont très sévères et ne peuvent s'expliquer uniquement que par un défaut de la TC-NER comme chez les patients XP (excepté les groupes XP-C et XP-E) qui sont également déficients en TC-NER, mais qui ne présentent pourtant pas les symptômes typiques de CS. Dans cette optique, des études ont démontré une altération de la transcription dans les cellules CS après les dommages à l'ADN. En effet, CSB peut interagir et former un complexe avec l'ARN Pol II, ce qui

stimule l'élongation de la transcription *in vitro* (Aamann, Muftuoglu, Bohr, & Stevnsner, 2013). Indiquant que, au-delà de son rôle dans la réparation de l'ADN, CSB joue un rôle dans la transcription. De plus, les cellules déficientes en CSB présentent des défauts dans la transcription et, la transcription est nettement réduite dans les cellules de patients atteints de CS (Velez-Cruz & Egly, 2013). La médiation de la transcription par CSB ne se limite pas à l'ARN Pol II, mais il a également été montré que CSB joue un rôle dans la transcription des gènes de l'ARNr par l'ARN Pol I. CSB se localise au niveau des sites de transcription de l'ADNr est fait partie d'un complexe protéique qui contient Pol I, TFIIH, et les facteurs d'initiation de transcription. Des mutations dans CSB perturbent le complexe Pol I / TFIIH / CSB et réduisent la synthèse de l'ARNr *in vivo* (Yuan, Feng, Imhof, Grummt, & Zhou, 2007). Un défaut dans la transcription a donc été suggéré pour expliquer les symptômes CS (Velez-Cruz & Egly, 2013). De toute évidence, un défaut dans la transcription compromet la fonction des cellules, induit la mort cellulaire prématurée et, par conséquent, accélère le vieillissement (Ljungman & Lane, 2004). Cet aspect explicite l'apparition du phénotype associé aux troubles neurologiques chez les patients CS. Par ailleurs, les patients XP ayant des défauts dans les gènes XPB, XPD et XPG souffrent d'un phénotype combiné XP / CS (Kraemer et al., 2007). En accord avec la connexion des symptômes du CS à un défaut dans la transcription, les deux hélicases XPB et XPD sont des sous-unités du facteur de transcription et de réparation TFIIH (Compe & Egly, 2012). XPG fait partie du complexe TFIIH et joue un rôle dans le maintien de sa stabilité (Ito et al., 2007). En plus, XPG interagit avec CSB et contribue à son rôle dans la transcription (Bradsher et al., 2002).

En ce qui concerne le syndrome de trichothiodystrophie, un lien entre TTD et la transcription a été établi. En effet, l'analyse des cellules provenant de patients atteints de TTD a montré un faible taux en TFIIH, donc un faible taux de transcription (Botta et al., 2002). Il a été suggéré que les gènes qui sont exprimés à des niveaux très élevés dépendent essentiellement d'un TFIIH stable dans les cellules différenciées (Viprakasit et al., 2001). Les cheveux cassants, une anomalie caractéristique des patients TTD, peut donc s'expliquer par une quantité insuffisante de TFIIH dans les kératinocytes, qui induit une réduction de l'expression des protéines riches en cystéine.

Cependant, comment différentes ou des mutations dans les mêmes gènes conduisent-elles à des pathologies différentes (UV^SS/CS et TTD/XP) ? Cette question demeure énigmatique.

Pour résumer, on peut dire que des défauts dans la GG-NER prédisposent au cancer, et des défauts dans la transcription prédisposent au vieillissement prématuré ainsi qu'à des troubles neurologiques. L'équilibre entre GG-NER et TC-NER est donc crucial pour la protection contre ces pathologies. Un déficit en TC-NER provoque un stress atranscriptionnel au niveau des cellules, entraînant à la fois une accélération du vieillissement, une neurodégénérescence et une forte protection contre le cancer. Cependant, lors d'une déficience de la GG-NER, la TC-NER reste fonctionnelle et favorise la survie des cellules; le vieillissement est retardé au détriment de l'accumulation des lésions de l'ADN qui se traduit par une mutagenèse qui entraîne une augmentation du risque de cancer. Ceci est valable pour toutes les protéines de la NER du fait de leur rôle potentiel dans la transcription, excepté la protéine XPA.

Le groupe des patients XP-A est le deuxième groupe XP le plus fréquent. Il se caractérise par la forme la plus sévère qui combine cancer de la peau et haut risque de dégénérescence neurologique. Cependant, aucune explication des symptômes neurologiques chez les patients XP-A n'a encore été proposée.

XPA est une protéine de liaison à l'ADN. Après la reconnaissance de la lésion et l'ouverture de la double hélice, elle forme un complexe avec la protéine de réplication A1 (RPA1) pour servir de plate-forme aux endonucléases XPF et XPG dans la NER (Tsodikov et al., 2007). XPA interagit avec DDB2 (Wakasugi et al., 2009), cette interaction permet le recrutement de XPA aux sites endommagés *in vivo*. Elle est aussi nécessaire pour stimuler l'excision des CPD *in vitro* (Wakasugi et al., 2009). Une interaction entre XPA et PCNA est essentielle pour la réparation par excision de nucléotides (Gilljam, Muller, Liabakk, & Otterlei, 2012). En effet, une altération de cette interaction conduit à une réduction de la croissance cellulaire, une augmentation de l'arrêt en phase S et une diminution de l'efficacité de la NER (Gilljam et al., 2012). CEP164 est une protéine centrosomale impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN. CEP164 est recrutée au niveau des photoproduits via son interaction avec XPA. Cette interaction permet la phosphorylation de CEP164 par ATR, et conduit à l'accumulation de Chk1 (Pan & Lee, 2009). L'interaction CEP164-XPA est critique pour la sensibilité aux UV (Pan & Lee, 2009).

XPA est la cible des modifications post-traductionnelles telles que la désacétylation par la NAD-dépendante acétyl-transférase 1 sirtuines (SIRT1) (Fan & Luo, 2010). Des études *in vitro* ont montré que XPA peut être acétylée au niveau de la Lys63 et Lys67 par SIRT1 dès les premiers stades d'un dommage à l'ADN induit par

UV. Ce processus qui diminue avec le temps provoque une augmentation de l'expression de SIRT1. En outre, XPA acétylée peut inhiber l'interaction XPA-RPA, régulant ainsi négativement la NER (Fan & Luo, 2010). Globalement, la désacétylation de XPA est nécessaire pour promouvoir la réparation de l'ADN.

Pour l'activation de la NER, ATR doit phosphoryler XPA au niveau de la serine 196 (Wu, Shell, Yang, & Zou, 2006). Après irradiation aux UV, XPA interagit physiquement avec ATR dans le noyau, pour activer la NER et promouvoir la résistance aux UV (Wu et al., 2006). La mutation (Ser 196 Ala) qui altère la phosphorylation de XPA par ATR provoque une sensibilité accrue aux UV. La phosphorylation d'XPA par ATR, augmente la stabilité de XPA en inhibant son ubiquitination par HERC2, qui conduit à sa dégradation (Lee, Park, Leem, & Kang, 2014).

Bien que la protéine XPA soit principalement impliquée dans la NER, quelques études ont suggéré qu'elle pourrait avoir des fonctions supplémentaires en dehors de la NER telles que : la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN, du fait de l'augmentation des niveaux de ROS dans les cellules XP-1 des nématodes et les cellules Xpa^{-/-} des souris (Arczewska et al., 2013). Ainsi, l'oxydation des nucléotides a été observée dans le cerveau des patients XP-A (Berra et al., 2013; Hayashi, Araki, Kohyama, Shioda, & Fukatsu, 2005). D'autre part, XPA pourrait être impliquée dans d'autres processus cellulaires, puisque les cellules déficientes en XPA révèlent des niveaux faibles en acide rétinolique. Le traitement de ces cellules avec de l'acide rétinolique diminue la sensibilité aux UV à travers un mécanisme inconnu (Ding et al., 2001). D'autre part, XPA est soupçonnée être un facteur de transcription recruté par les

promoteurs des gènes, même en l'absence de dommages. Cependant, aucun défaut de transcription n'a été observé chez les patients XP-A (Le May et al., 2010).

Par ailleurs, les patients XP-A présentent un dysfonctionnement mitochondrial (Fang et al., 2014). Or, les mitochondries ``centrales énergétique`` sont impliquées dans une multitude de réseaux métaboliques, et jouent un rôle important dans le maintien de la vie cellulaire (Green, Galluzzi, & Kroemer, 2011). Les neurones sont particulièrement vulnérables aux altérations mitochondriales en raison de leurs besoins énergétiques. Par conséquent, un dysfonctionnement mitochondrial peut être à la base de nombreuses maladies neurodégénératives (Aamann et al., 2010). Les Altérations mitochondriales représentent donc une explication plausible aux phénotypes neurologiques observés chez les patients XP-A.

Avec toutes ces suggestions, les mécanismes moléculaires qui induisent les symptômes neurologiques observés chez les patients XP-A ne sont toujours pas clairs. De ce fait, nous émettons l'hypothèse qui suit:

Hypothèse et objectifs

Les symptômes neurologiques et les phénomènes observés dans les cellules des patients XP-A nous laissent suggérer qu'en dehors de son rôle dans la NER, la protéine XPA assure d'autres fonctions dans d'autres processus cellulaires en interagissant avec des partenaires protéiques différents de ceux qui sont déjà connus.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons :

- Identifié les partenaires protéiques de XPA, en présence et en absence de dommages à l'ADN, en utilisant une purification en tandem d'affinité couplée à une LC-MS/MS;
- validé l'interaction de XPA avec les nouveaux partenaires protéiques;
- mesuré l'efficacité de la réparation par excision des nucléotides en fonction du cycle cellulaire, après diminution de l'expression des nouveaux partenaires de XPA;
- déterminé l'effet des nouveaux partenaires protéiques de XPA sur la survie cellulaire, après traitement avec différents agents génotoxiques.

Matériel et Méthodes

Culture cellulaire

Les cellules HeLa-S ainsi que les Phoenix nous ont été gracieusement donnés respectivement par les Dr Affar El Bachir (Université de Montréal) et Dr Frédérick Antoine Mallette (Université de Montréal). Ces cellules ont été maintenues dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Invitrogen), supplémenté avec 10 % de serum foetal bovin (FBS) (Gibco® | Life Technologies), 4mM L-glutamine (Gibco® | Life Technologies) et 1 % de streptomycine-pénicilline (Invitrogen).

Les cellules primaires des fibroblastes pulmonaires humains (LL) ont été fournies par l'institut Coriell. Les cellules LL ont été cultivés dans du EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (Wisent), supplémenté avec 15% FBS (Gibco® | Life Technologies), des acides aminés essentiels et non essentiels (Gibco® | Life Technologies), 4mM L-glutamine (Gibco® | Life Technologies), 0,5 % de pénicilline-streptomycine (Gibco® | Life Technologies) et 1% de vitamines (Gibco® | Life Technologies).

Toutes ces lignées cellulaires ont été maintenues en culture dans des incubateurs à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂.

Construction des plasmides exprimant XPA-Flag-HA

Le clonage a été réalisé selon la technique Gateway® (Invitrogen/Life Technologies), une méthode universelle de clonage qui tire parti des propriétés de recombinaison du bactériophage lambda (Landy, 1989) et représente un moyen rapide et très efficace pour le clonage des gènes dans plusieurs systèmes de vecteurs.

Pour cloner notre gène d'intérêt (XPA) selon la technologie Gateway®, la stratégie consistait à amplifier par RT-PCR l'ADNc de XPA à partir des ARNm totaux extraits des cellules LL en incluant une séquence (CACC) dans l'extrémité 3' de l'amorce *Forward*. L'amplification par RT-PCR a été réalisée avec les amorces suivantes :

XPA-Forward :

CACCATGGCGGGCCGACGGGGCTTTG

XPA-Revers :

TCACATTTTTTCATATGTCAG

Le vecteur de clonage pENTR/D-TOPO ® (Invitrogen /Life Technologies) est fourni sous une forme ouverte avec la séquence (GTGG) à son extrémité 5' (Figure 3a). De cette manière, le produit de la PCR s'apparie directement au vecteur de clonage par homologie de séquence. Ultérieurement, l'ADNc de XPA sera recombiné dans un vecteur d'expression MSCV-Flag-HA (Addgene). Ce plasmide est un vecteur retroviral avec un promoteur LTR qui permet l'expression des protéines recombinantes dans les cellules des mammifères. MSCV-Flag-HA se compose d'une cassette de résistance à la puromycine, un site de clonage multiple ainsi qu'une région codante de l'étiquette Flag et HA en N – terminal (Figure 3b). C'est un vecteur de destination Gateway ®. La recombinaison par la technologie Gateway® consiste à recombiner respectivement les sites attL1, attL2 qui délimitent l'ADNc de la protéine recombinante au niveau du vecteur pENTR/D-TOPO ® et les séquences attR1 et attR2 au niveau du MSCV (Figure3) via une recombinaison Gateway® LR Clonase®. Ainsi l'ADNc de XPA était doublement marqué.

$\mu\text{g/mL}$ de polybrène (SIGMA-ALDRICH) sont ajoutés à 3.10^6 de HeLa-S sur des pétries 100mm. Après 24h d'incubation, le milieu contenant les virus est remplacé par un milieu frais composé de $2\mu\text{g/mL}$ de puromycine (Invitrogen /Life Technologies) afin de sélectionner des lignées stables.

À partir de cette population hétérogène, des clones individuels sont produits sur une plaque de 96 puits et cultivés pendant 2 semaines. 20 clones ont été sélectionnés. Chaque clone a ensuite été analysé par immunobuvardage afin d'isoler ceux qui expriment la protéine recombinante au même niveau que la protéine endogène.

Immunobuvardage

L'expression de XPA-Flag-HA a été vérifiée par immunobuvardage. Les cellules sont d'abord remises en suspension dans du tampon de lyse RIPA contenant (500mM Tris pH8, 150mM NaCl, 0.5% Sodium Deoxycholate, 1% Triton X100, 0.1% SDS) en présence de 1 % du cocktail des inhibiteurs de protéases (SIGMA-ALDRICH), 100 mM NaF, 0,5 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF et 1 mM de β -glycérol phosphate pour inhiber l'activité des protéases et des phosphatases. Après 15min d'incubation sur glace, l'extrait est soniqué puis centrifugé à 3000 rpm durant 2 min; et le surnageant est récupéré. Les protéines sont dosées à l'aide d'un kit BCA (Pierce) et d'un lecteur de microplaques Biotek Elx808. Par la suite, elles sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puis transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) (BIO RAD). La membrane est bloquée avec une solution contenant du TBST avec 5% de BSA afin d'empêcher toute liaison non spécifique des anticorps sur la surface de la membrane. L'anticorps pour XPA est (Abnova, H00007507-D01P, lapin, dilué à

1 :1000), l'anticorps pour HA est (Cell Signaling,#3724, lapin, 1 :1000) et l'anticorps pour YY1est (Santa Cruz Biotechnology, sc-281, lapin, 1 :1000).

La membrane a été révélée par chimioluminescence, puis analysée avec un appareil Fujifilm LAS-4000.

Les anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont :

MRE11(SantaCruz Biotechnology, sc-5859, chèvre, 1 :1000), **Rad50** (SantaCruz Biotechnology, sc-56209, souris, 1 :1000), **NBS1** (Gene Tex, GTX30125, lapin, 1:1000), **SMC1** (Bethyl, A300-055A, lapin, 1:1000), **SMC3** (Bethyl, A302-068A, lapin, 1:1000), **WAPL**(abcam, ab109537, lapin, 1 :1000), **Rad21** (Cell Signaling, #4321, lapin, 1:1000), **XPF** (abcam, ab84540, lapin, 1 :1000), **Chk1** (Cell Signaling, #9931, souris, 1:500), **GAPDH** (Millipore, mab374, souris, 1 :2000), **γ H2AX** (Millipore, 05-636, souris, 1 :1000).

Les anticorps secondaires utilisés sont :

Un anti lapin (Santa Cruz Biotechnology, 1/2000), un anti souris (SantaCruz Biotechnology,1/2000), puis un anti chèvre (Santa Cruz Biotechnology, 1/2000).

Immunofluorescence

Les HeLa-S-XPA-Flag-HA sont ensemencées à environ 600.000 cellules sur des lamelles dans des plaques de 6 puits, puis fixées avec du formaldéhyde à 3% (SIGMA-ALDRICH) pendant 20 minutes à température pièce. Les cellules sont ensuite lavées deux fois au PBS, puis perméabilisées avec un tampon contenant du PBS à 0.5% de NP-40 (SIGMA-ALDRICH) et 1mM de sodium azide (SIGMA-ALDRICH) pendant 30

minutes. Une fois la perméabilisation terminée, les cellules sont lavées au PBS puis bloquées avec une solution de PBS contenant 0,1 % de NP-40 (SIGMA-ALDRICH) et 10 % de FBS (Gibco® | Life Technologies) pendant 1h à 4°C. XPA-Flag-HA est ensuite marquée par l'anticorps anti-HA (cell signaling, #3724, lapin, 1 :500), puis par un anticorps secondaire anti-lapin conjugué au colorant fluorescent Alexa-fluor 647 (Invitrogen, 1 :1000). Les noyaux ont été marqués au 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, 1 :1000). Les images ont été prises par un microscope Leica DMRE avec un objectif HCX PL APO 63 et une caméra Retiga EX (Qimaging). Finalement, l'analyse a été réalisée par le programme ImageJ.

Purification des complexes protéiques par la méthode TAP

Les clones qui expriment la protéine de fusion sont cultivés pour atteindre un total de 7×10^9 cellules. Ces cellules sont récupérées par centrifugation pendant 15min à 3000 rpm à 4°C. Le culot est lavé avec du PBS froid. L'extraction des protéines nucléaires est effectuée à l'aide d'un homogénéisateur Dounce dans un tampon hypotonique (10 mM Tris pH 7.3, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 25mM NaF, 10 mM β glycerole phosphate, 10 mM de PMSF). Après 20 cycles de compression, l'homogénat est centrifugé pendant 15 min à 4000rpm. Le surnageant subit une extraction saline à l'aide d'une solution constituée de (10mM Tris pH 7.3, 0.2mM EDTA, 0.3M KCl, 25% Glycerol 100%, 10mM PMSF) afin de récupérer les protéines nucléaires solubles.

L'extrait est ensuite ultracentrifugé à 4°C à une vitesse de 14 000 rpm pendant 1 h. Le surnageant est dialysé durant 5h à 4°C dans un tampon de dialyse constitué de (10 mM Tris pH 7.3, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 50mM KCl, 10mM PMSF) afin d'éliminer l'excès de sel. L'extrait nucléaire est ainsi récupéré et une autre centrifugation

à 4°C pendant 1h à 14 000 rpm est réalisée pour éliminer la chromatine. Une fois débarrassé de la chromatine, l'extrait nucléaire est ensuite incubé avec les billes IgG Flag (SIGMA-ALDRICH) pendant la nuit à 4°C avec agitation. Les billes sont ensuite récupérées, puis lavées 5 fois avec un tampon constitué de (50mM Tris HCl pH 7.3, 10% Glycérol, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.1% NP40).

Les protéines appâts sont éluées par transfert des billes sur une colonne de chromatographie Bio-spin (Bio-Rad) dans un tampon constitué de (200mM Tris HCl pH 7.9, 10% Glycerol, 100mM Kcl, 5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.1% NP40, et 0.2mg/mL de peptides Flag (SIGMA-ALDRICH). L'éluât est récupéré et mis en présence de billes HA (SIGMA-ALDRICH) qui sont incubées pendant ? La nuit à 4°C avec agitation. Et comme pour les billes Flag, les billes HA sont lavées 5 fois et une deuxième élution est réalisée avec des peptides HA.

L'éluât obtenu est traité avec 30% de TCA (Invitrogene /Life Technologies) pour précipiter les protéines qui sont ensuite chargées sur un gel à gradient NuPAGE 4-12% Bis-Tris 1.0 mm (Invitrogen) et séparées par électrophorèse. Le gel est coloré au SyproRuby, puis découpé en 10 bandes. L'identification des protéines dans chaque bande est réalisée par la plateforme de spectrométrie de masse et protéomique du Harvard Medical School (Taplin).

La co-immunoprécipitation

Environ 3×10^7 HeLa-S sont lysées sur glace pendant 20 min dans un tampon constitué de (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1mM EDTA) en présence de 1mM PMSF, 1mM NaF, 1mM β Glycerol phosphate et 1 :100 de cocktail

d'inhibiteurs de protéase (SIGMA-ALDRICH). Après lyse, les cellules sont centrifugées pendant 20 min à 14.000 rpm à 4°C afin de récupérer les extraits protéiques. Ces derniers sont incubés avec les billes Flag (SIGMA-ALDRICH) pendant 6 heures à 4°C avec agitation. Les billes sont par la suite précipitées par centrifugation à 1500 rpm pendant 2 minutes. Le culot est lavé cinq fois avec un tampon (25 mM Tris-HCl pH 7,4 100 mM NaCl 0,5% NP-40 plus les imhibiteurs de protéase). Finalement, les protéines sont décrochées des billes par élution thermique à 100°C pendant 5 minutes dans le tampon de chargement 2X.

Déplétion des protéines par les petits ARN d'interférence

Pour diminuer l'expression des protéines, des siARN SmartPools (Dharmacon) ont été transfectés dans des cellules HeLa de la manière suivante :

La veille de la transfection, $2 \cdot 10^6$ HeLa sontensemencées dans un pètrie de 100mm. Le lendemain, les cellules sont incubées pendant 1h avec 4mL de milieu sans antibiotiques. En même temps, un mélange de 1mL d'opti-MEM (Invitrogen), avec 12,5 µL de lipofectamine2000 (Invitrogen) et 10µL de siRNA est préparé et incubé pendant 1h à température pièce. Après 1h d'incubation, ce mélange est ajouté aux cellules et le tout est incubé à 37°C durant 5 à 7h. Une deuxième transfection est réalisée 24h après afin de maximiser la diminution de l'expression des protéines.

Traitement aux agents mutagènes

Irradiation aux UV

Pour la mesure de l'efficacité de la NER, 24h avant l'irradiation, 750.000 cellules sontensemencées dans des pètris de 60mm. Le lendemain, elles sont rincées au PBS, puis

irradiées dans du PBS aussi, car le rouge phénol contenu dans le milieu de culture absorbe les UV. Les cellules sont ensuite exposées à une dose de $25\text{J}/\text{m}^2$ de 254-nm d'UVC à une fluence de $1\text{J}/\text{m}^2/\text{s}$ à l'aide d'une lampe germicide Philips G25T8. Une fois l'irradiation terminée, un milieu frais est remis.

Pour mesurer la survie clonogénique, 1500 cellules sontensemencées 7h avant l'irradiation afin de les fixer. Une fois fixées, elles sont irradiées à 7,5J d'UVC à une fluence de $1\text{J}/\text{m}^2/\text{s}$ à l'aide d'une lampe germicide Philips G25T8.

Traitement aux radiations Gamma

Les HeLa sont traitées avec une dose de 7,5Gy de rayonnement γ au Gammacell Ellan 300. Elles sont par la suite lavées avec du PBS 1X, puis remises à 37°C .

Traitement au CDDP

Une solution stock de CDDP est préparée en dissolvant le CDDP (LKT Laboratories, # C3374) dans une solution saline à 0.9% NaCl. Les HeLa sont traitées avec $6\mu\text{g}/\text{mL}$ de CDDP pendant 1h à 37°C et sont ensuite lavées avec 1X PBS, puis additionnées de milieu frais.

Test de survie cellulaire

Sept heures avant le début de l'expérience, 1500 cellules HeLa sontensemencées dans des pétris 100mm. Une fois fixées, ces cellules sont traitées avec des agents mutagènes (UV, IR et CDDP) tel qu'expliqué plus haut. Après 2 à 3 semaines de culture à 37°C , les colonies présentes sur les pétries sont fixées et colorées pendant 5min avec 0.5% de bleu méthylène (Sigma) dans 50% de méthanol, puis rincées avec de l'eau. La

survie est considérée comme étant le pourcentage de survie clonogénique par rapport aux cellules contrôles non traitées.

Essai de réparation des 6-4PP en fonction du cycle cellulaire

Une fois irradiées, les HeLa sont lavées au PBS puis réincubées à 37°C dans un milieu de culture complet pour le temps correspondant. Les cellules sont ensuite trypsinisées, centrifugées, resuspendues dans 1mL de PBS et 3 mL d'éthanol anhydre puis gardées à -20°C pendant au moins 12h pour se fixer. Une fois fixées, elles sont perméabilisées par la suspension dans une solution acide constituée de 0.5% triton X-100 (Sigma) à laquelle est ajouté 0.2N d'acide chlorhydrique (Fisher Scientific) pendant 10 min à température ambiante. Après centrifugation et rinçage au PBS, les cellules sont resuspendues dans du PBS contenant 100ug/mL d'ARNase A (Invitrogen) pendant 45 minutes à 37°C. Elles sont par la suite marquées avec l'anticorps murin anti-6-4PP (Kamiya Biomedical, 1 :1000) durant 1.5h à température ambiante, puis avec l'anticorps secondaire anti-murine couplé à la fluorescence (FITC) (Sigma, 1 :200) pendant 1h. Finalement, le marquage de l'ADN cellulaire est fait à l'iodure de propidium (PI) par suspension des cellules dans une solution de PBS contenant 5mg/mL de PI (Invitrogen); le tout est incubé pendant 15 à 30min.

Le taux des 6-4PP dans chaque cellule est déterminé par la cytométrie en flux, en utilisant soit le FACScan ou bien le FACSCalibur (BD) en combinaison avec le logiciel FlowJo. Par FlowJo, l'intensité du signal FITC représente la quantité en 6-4PP et la proportion en PI permet de distinguer la position de la cellule dans le cycle cellulaire. Le taux de réparation des 6-4PP est déterminé comme étant l'intensité de fluorescence

obtenue moins l'intensité du bruit de fond, le tout divisé par l'intensité de fluorescence obtenue à 0h après irradiation moins l'intensité du bruit de fond.

Résultats

Expression de XPA qui est doublement marquée à Flag et HA dans les HeLa-S

Après avoir cloné XPA dans le vecteur d'expression MSCV-Flag-HA, des lignées de HeLa-S exprimant cette protéine de manière stable ont été établies par infection virale. Les HeLa-S ont été choisies comme système d'expression, car elles se multiplient en grand nombre en suspension, et on obtient beaucoup plus facilement un échantillon à grande échelle comparativement aux cellules adhérentes. De plus, les HeLa-S ont déjà été utilisées avec succès pour isoler des complexes protéiques à grande échelle (Gregan et al., 2007; Lau et al., 2009).

L'expression de XPA a été vérifiée par immunobuvardage. Au niveau du contrôle négatif, i.e. HeLa-S non transfectées, on voit uniquement une bande à ~ 40 KDa correspondant à XPA endogène, avec absence d'une bande après son exposition avec l'anticorps HA (Figure 3). À l'opposé, après leur exposition avec l'anticorps XPA, dans chaque clone, on constate la présence de deux bandes représentant XPA endogène et XPA-Flag-HA. On voit aussi que le niveau d'expression de XPA recombinante est proche du niveau physiologique, et c'est important pour éviter tout effet indésirable lié à la surexpression de la protéine.

De plus, XPA-Flag-HA qui est exprimée dans les cellules HeLa-S a été visualisée par immunofluorescence (Figure 4) dans le but de déterminer la fraction des cellules exprimant la protéine recombinante dans chaque clone. Il faudrait que la majorité des cellules expriment XPA-Flag-HA pour pouvoir réaliser la purification.

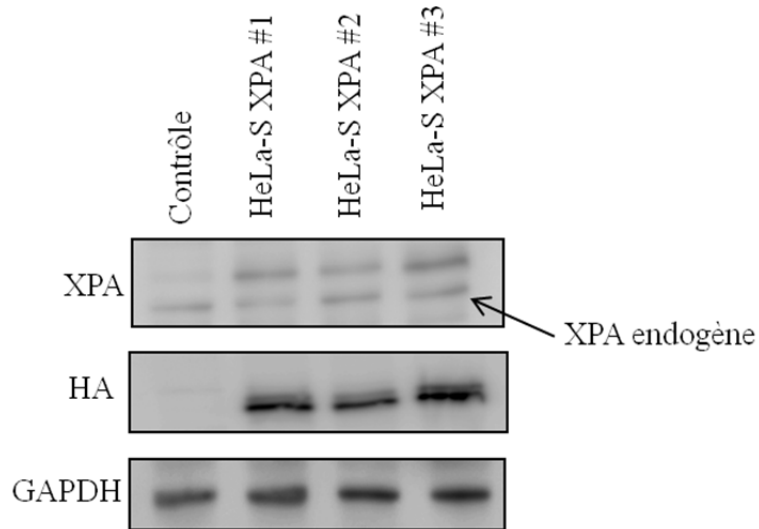


Figure 3: Expression de XPA marquée à Flag et HA dans les cellules HeLa-S

Immunobuvardage montrant le niveau d'expression de XPA-Flag-HA. Les cellules HeLa-S non transfectées ont été utilisées comme contrôle. Les échantillons # 1, 2 et 3 représentent les clones qui expriment XPA-Flag-HA au même niveau que XPA endogène.

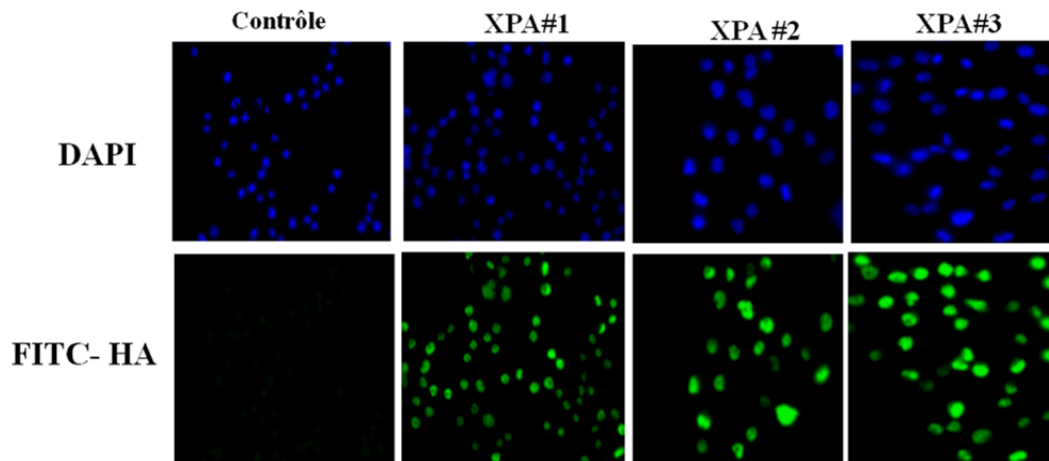


Figure 4: Détection de XPA-Flag-HA dans les cellules HeLa-S par immunofluorescence. Le noyau est coloré en bleu par le DAPI, XPA-Flag-HA est colorée en vert (FITC). Les cellules contrôles représentent les HeLa-S non transfectées.

Traitement des lignées stables au cisplatine

Nous nous sommes intéressés à purifier le complexe XPA dans deux conditions différentes: (a) dans des cellules non traitées et (b) des cellules exposées à des dommages de l'ADN. Comme agent endommageant l'ADN, nous avons choisi le cisplatine (CDDP). Tout comme les UV, le CDDP permet la formation d'adduits intracaténaux qui induisent une distorsion de l'hélice de l'ADN (*helix distorting*) et qui sont réparés par la NER. Le cisplatine a été choisi à la place des UV pour les raisons techniques suivantes : l'irradiation des HeLa-S est très difficile, vu que ces cellules poussent en suspension à grande échelle dans des flacons rotatifs (*spinners flasks*) alors que l'irradiation aux UV nécessite que les cellules soient en monocouche. De ce fait, les cellules ont été traitées avec un agent mimant l'effet des UV : le CDDP.

Pour déterminer la dose optimale en CDDP, nous avons évalué le taux de γ H2AX et pChk1, les deux marqueurs majeurs de dommages à l'ADN, après traitement des HeLa-S pendant 3h avec différentes concentrations en cisplatine (Figure 5). Les complexes protéiques ont été purifiés après traitement avec 100 μ M de cisplatine, dose jugée optimale du fait qu'elle permet une forte induction de γ H2AX et pChk1.

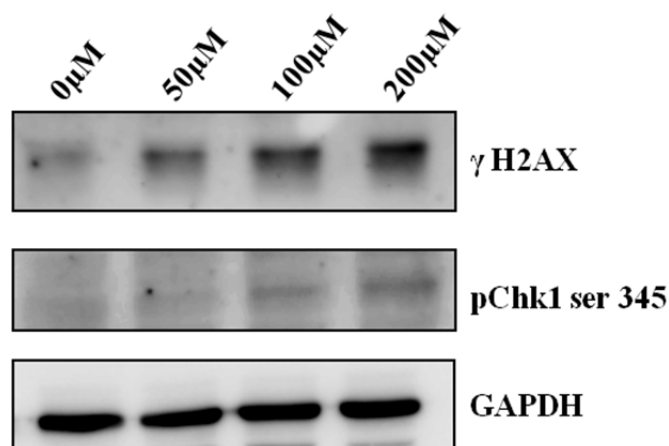


Figure 5 : Induction de γ H2AX et pChk1 dans les cellules HeLa-S-XPA-Flag-HA après traitement au CDDP. Les cellules HeLa-S-XPA-Flag-HA ont été traitées avec différentes concentrations en cisplatine (0, 50, 100, 200 μ M) pendant 3h à 37°C et soumises à un immunobuvardage afin de vérifier l'induction de γ H2AX et pChk1. GAPDH est utilisé comme contrôle de chargement.

Purification des complexes protéiques de XPA par la méthode en tandem d'affinité (TAP)

La purification en tandem d'affinité a été réalisée à partir des clones 1,2 et 3 combinés. Le fait de combiner les trois clones ensemble, réduit les conséquences néfastes du transgène sur le comportement génétique de la cellule. Car, l'intégration du transgène est aléatoire et différente d'un clone à un autre. Les cellules sont par la suite divisées en deux groupes : un groupe traité à 100 μ M de CDDP et un autre groupe non traité. Les échantillons protéiques sont passés sur une colonne d'affinité contenant des billes Flag pour assurer la fixation de XPA grâce à son étiquette Flag. Les complexes protéiques fixés sont séparés des billes par compétition à l'aide des peptides Flag. L'éluât passe ensuite sur une colonne d'affinité HA. L'utilisation de deux colonnes successives permet la réduction des interactions non spécifiques. Les protéines obtenues après élution avec le peptide HA sont séparées selon leur poids moléculaire sur gel d'électrophorèse en

condition dénaturante. Les bandes du gel ont été révélés par une coloration au Sypro Ruby qui est conforme avec l'analyse par spectrométrie de masse (Figure 4).

Par une analyse visuelle du gel, on constate une différence dans le contenu protéique des deux complexes (+/- CDDP). Après dommage à l'ADN, plusieurs bandes supplémentaires ont été observées dans la région correspondant à des protéines entre 80 et 150 KDa (Figure 6). Cette constatation est soutenue par le résultat de la spectrométrie de masse. En effet, 434 protéines ont été recouvertes dans le complexe de XPA non traité contre 870 protéines après traitement. Les deux complexes ont un pourcentage de similitude de 46%. Cependant, 51 % des protéines totales (des deux complexes) apparaissent uniquement en présence de cisplatine et 3% sont présentes exclusivement en absence de cisplatine. Les protéines des deux complexes sont celles qui sont impliquées dans les voies de réparation des dommages à l'ADN, dans la machinerie transcriptionnelle, la réplication, le remodelage de la chromatine, le cycle cellulaire ainsi que le métabolisme. La plupart des partenaires de XPA déjà connus ont été retrouvés (Tableau 3). Ce résultat vient confirmer ce qui se trouve dans la littérature. En effet, Il a déjà été montré que XPA interagit avec ces partenaire de la NER en l'occurrence XPC, XPG, TFIIH, XPF, ERCC1 et RPA (Ziani et al., 2014). Et, comme attendu, en situation de stress ces interactions sont stimulées (Shell & Zou, 2008). De plus, les dommages à l'ADN stimulent l'interaction XPA- PARP1 (King, Cooper, Liu, & Hudson, 2012).

Étant donné le nombre élevé de protéines identifiées, seulement une trentaine ont été sélectionnées à partir des deux complexes pour réaliser un criblage. La plupart ont été choisies parce qu'elles ne figurent que dans le complexe XPA après dommage à l'ADN (Tableau 4a) et qu'elles sont soupçonnées jouer un rôle dans la NER. D'autres protéines

sont choisies en raison de leur petit nombre en peptides qui double et même triple après traitement; ce qui laisse suggérer qu'elles régulent la NER (Tableau 4b). Les protéines les plus abondantes dans les deux complexes ont également été choisies, parce que la présence d'un nombre élevé en peptides présume que ce sont de vrais partenaires de XPA (Tableau 4c). Enfin, une protéine présente uniquement en absence de traitement a été choisie (Tableau 4d).

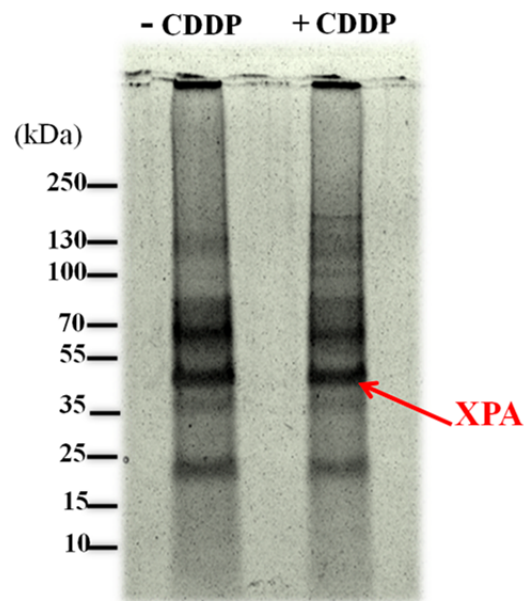


Figure 6 : Purification des partenaires protéiques de XPA en présence et en absence de dommage à l'ADN. Les supposés partenaires protéiques de XPA ont été migrés sur gel SDS-PAGE 4-12 % et colorés au Sypro Ruby.

Tableau3 : Les partenaires de XPA déjà connus. Le nombre de peptides dans chaque conditions (+/- CDDP) pour chacun des partenaires de XPA déjà connus, retrouvés dans notre purification.

	Nombre de peptides simples	
	(-) CDDP	(+) CDDP
RPA 1	220	213
PRKDC	75	159
TFIIH	49	70
PARP1	48	55
RPA2	29	25
XPF	19	68
Rad23	11	0
XPG	10	64
ERCC1	9	22
RPA3	8	6
XPC	5	0

Tableau 4: Liste des protéines candidates sélectionnées pour le criblage. a) Liste des protéines sélectionnées présentes uniquement après dommage à l'ADN. b) les protéines dont le nombre de peptides double après traitement au CDDP. c) les protéines présentes dans les deux complexes. D) Protéine présente uniquement en absence de CDDP.

Nom du gène	Nom de la protéine	Description de la protéine	Nombre de peptides (- CDDP)	Nombre de peptide(+CDDP)
<i>MTA2</i>	Metastasis-associated protein MTA2	component of NuRD complex	0	34
<i>WRIP</i>	Werner helicase-interacting protein 1	replication initiation; damage sensor	0	31
<i>Rad21</i>	Double-strand-break repair protein rad21 homolog	cohesin, implicated in cell cycle DSB repair	0	26
<i>DNMT1</i>	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	DNA methylase	0	26
<i>CDC73</i>	Parafibromin	tumor suppressor, component of the PAF1 complex	0	22
<i>MTA1</i>	Metastasis-associated protein MTA1	component of NuRD complex	0	15
<i>BRD7</i>	Bromodomain-containing protein 7	coactivator/corepressor, recruits BRCA1, interacts with p53	0	15
<i>Rad17</i>	Cell cycle checkpoint protein RAD17	ATR activation	0	14
<i>NUDC</i>	Nuclear migration protein nudC	synthesis of guanine nucleotides, regulation of cell growth	0	13
<i>WAPL</i>	Wings apart-like protein homolog	cohesin	0	11
<i>REST</i>	RE1-silencing transcription factor	Transcriptional repressor of neuronal gene in non-neuronal cells	0	11
<i>POF1B</i>	Protein POF1B	ovary development	0	10
<i>CRNN</i>	Cornulin	Survival factor	0	9
<i>MLH1</i>	DNA mismatch repair protein Mlh1	DNA mismatch repair	0	9
<i>MDC1</i>	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	DNA damage signalling	0	6
<i>KDM5C</i>	Lysine-specific demethylase 5C	histone demethylase	0	6
<i>Rad50</i>	DNA repair protein RAD50	Implicated in Homologous recombination	92	288
<i>MRE11</i>	Double-strand break repair protein MRE11A	Implicated in Homologous recombination	81	146
<i>NPM</i>	Nucleophosmin	regulates of p53, stimulates APEX1, ribosome biogenesis, centrosome duplication, protein chaperoning, histone assembly, cell proliferation	28	87
<i>SMC1</i>	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	chromosome cohesion, spindle pole assembly during mitosis	19	83
<i>NBS1</i>	Nibrin	Implicated in Homologous recombination	14	64
<i>SMC3</i>	Structural maintenance of chromosomes protein 3	chromosome cohesion, spindle pole assembly during mitosis	14	93
<i>IMPDH</i>	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	purine metabolism	13	32
<i>LMNA</i>	Prelamin-A/C	component of the nuclear lamina, nuclear assembly, chromatin organization, nuclear membrane, telomere dynamics, development of peripheral nervous system	116	151
<i>XRCC6</i>	X-ray repair cross-complementing protein 6	Non homologous end joining	95	51
<i>XRCC5</i>	X-ray repair cross-complementing protein 5	Implicated in Non homologous end joining	84	50
<i>BLM</i>	Bloom syndrome protein	DNA helicase,	39	22
<i>PRDX1</i>	Peroxisredoxin-1	redox regulation, thioredoxin system	38	38
<i>PRDX2</i>	Peroxisredoxin-2	redox regulation, thioredoxin system	33	29
<i>ENO4</i>	Alpha-enolase	glycolysis enzyme	23	24
<i>MAD2</i>	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A	Component of the spindle-assembly checkpoint	3	0

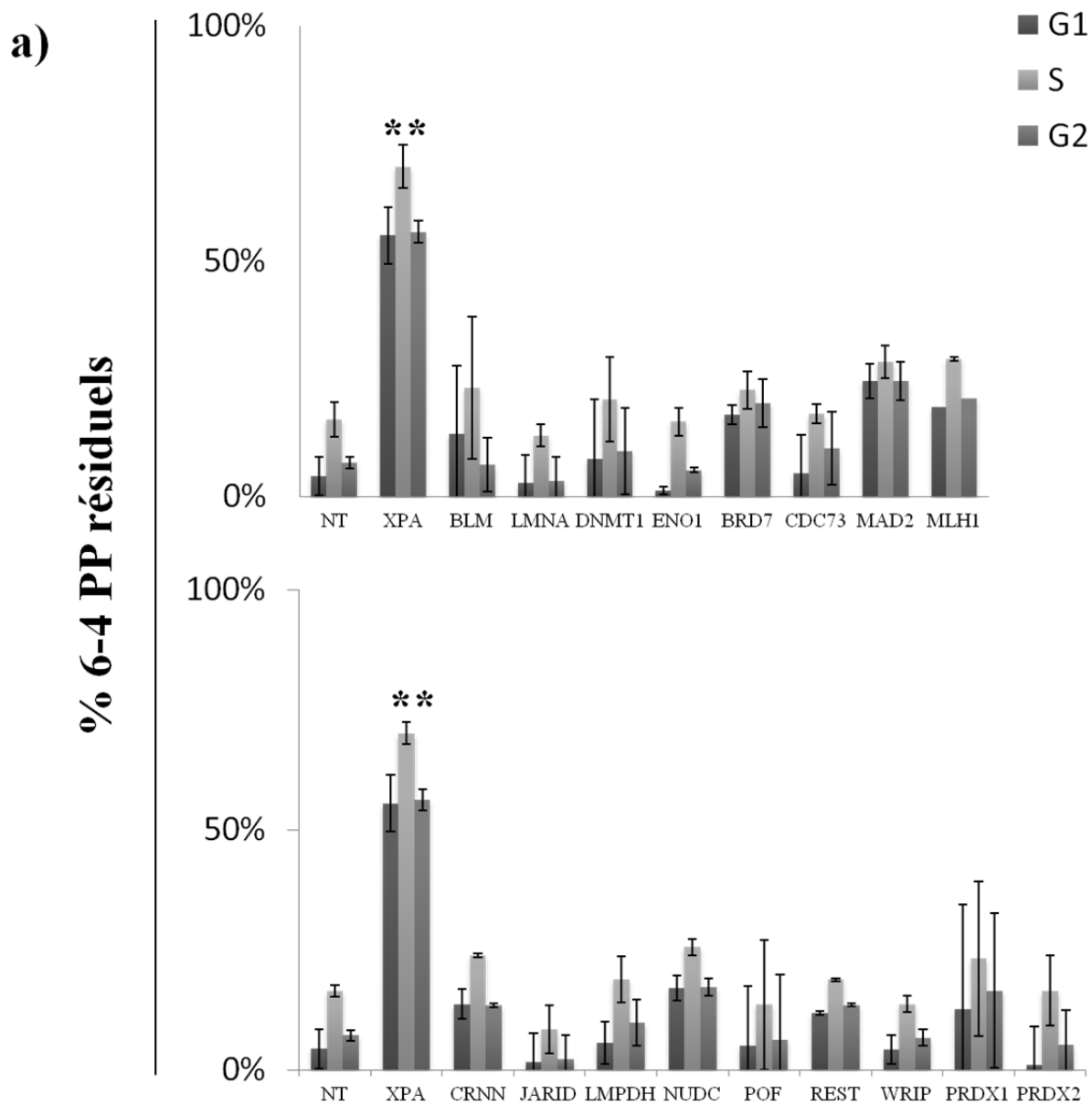
Criblage par les petits ARN interférents

Il était important de savoir si les partenaires potentiels de XPA sélectionnés régulaient la réparation par excision des nucléotides. Pour investiguer cette possibilité, nous avons utilisé une technique développée dans notre laboratoire (Voir matériel et méthodes (Auclair, Rouget, Affar el, & Drobetsky, 2008)) basée sur la cytométrie en flux et permettant de déterminer le taux des 6-4PP réparés selon les phases du cycle cellulaire. Nous avons donc combiné cette approche avec le criblage d'une bibliothèque de petits ARN interférents. La bibliothèque est constituée d'un pool de trois siRNA différents (pour avoir une bonne déplétion) pour chaque gène codant chaque protéine candidate.

Le résultat du criblage démontre que 3h après l'irradiation des cellules HeLa à 25J/m^2 d'UVC, aucun défaut dans la NER n'a été observé chez la majorité des protéines déplétées (Figure 7). Du fait que $\sim 90\%$ des 6-4PP sont réparés dans toutes les phases du cycle cellulaire, comme pour les cellules transféctées par un siRNA non spécifique. Tout de même, on constate qu'une déplétion des protéines RAD21, SMC1, SMC3, WAPL et MRE11 induit un léger défaut dans la réparation durant la phase-S où le pourcentage de 6-4 PP résiduels est $67 \pm 12\%$, $76 \pm 7\%$, $66 \pm 7\%$, $70 \pm 10\%$ et $65 \pm 2\%$ respectivement (Figure 7 b). Par contre, comme prévu (Belanger, Rajotte, & Drobetsky, 2014), un grand défaut dans la NER pendant toutes les phases est observé après la déplétion de XPA, et uniquement $30 \pm 4\%$ des 6-4 PP sont réparés. L'analyse du taux de réparation des 6-4PP après diminution de l'expression de XPA a été utilisée comme contrôle afin de s'assurer que notre technique fonctionne correctement chaque fois.

En nous basant sur le criblage initial, nous avons conclu que les protéines sélectionnées ne semblent pas réguler la NER de façon significative, à l'exception de

RAD21, SMC1, SMC3, WAPL, et MRE11 qui ont eu un effet modéré sur le processus de réparation. Pour confirmer ce résultat, un autre test a été effectué avec les mêmes protéines (voir section suivante).



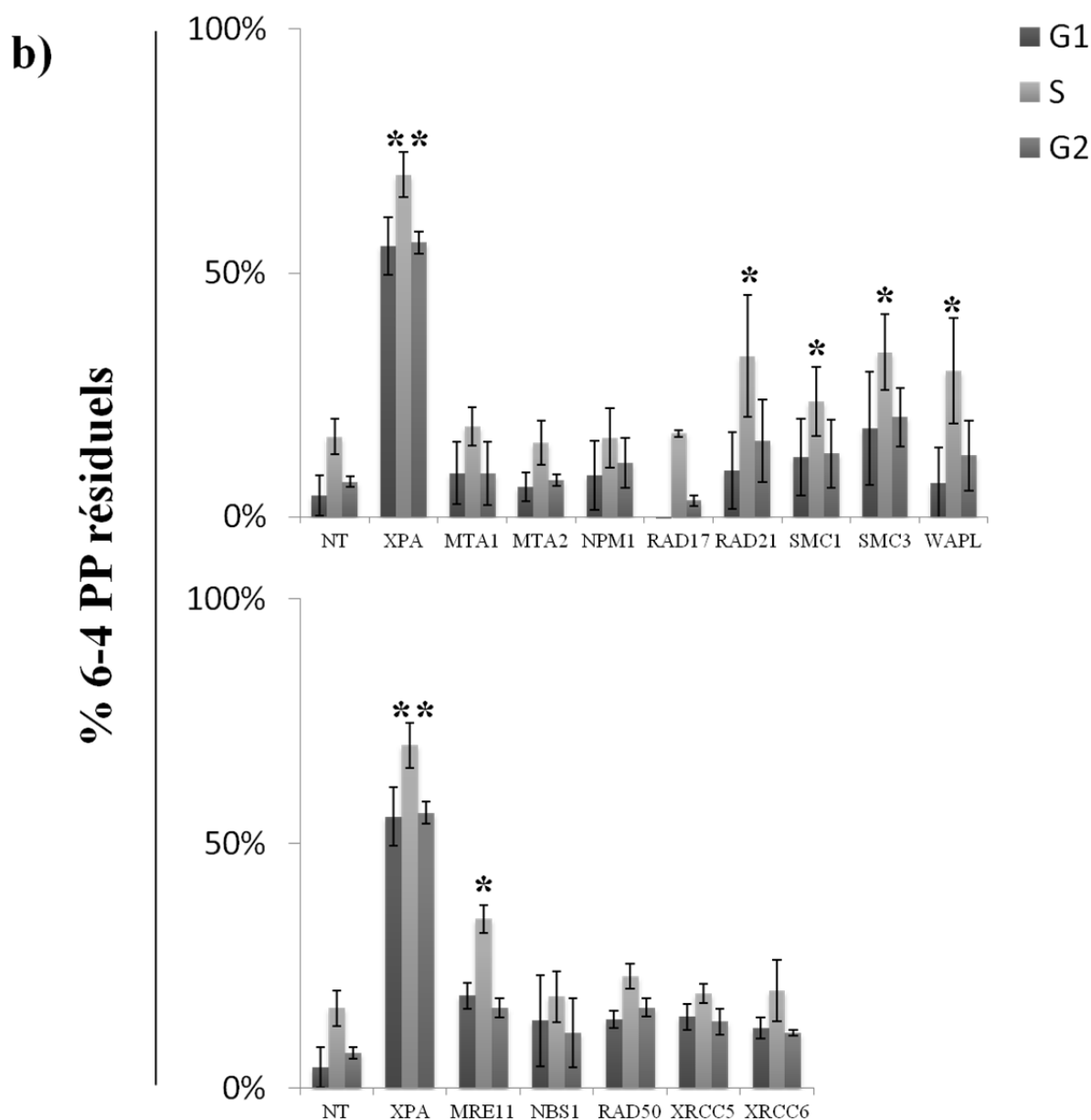


Figure 7: La réparation des 6-4PP en fonction du cycle cellulaire après déplétion des partenaires potentiels de XPA. a) et b) représentent le taux des 6-4PP déterminé à 3h après irradiation à $25\text{J}/\text{m}^2$ d'UVC des cellules HeLa transfectées par des siRNA (smart pool) dirigés pour chaque protéine sélectionnée. *, $p < 0.05$ associée à un test T de Student à savoir si la quantité des 6-4PP résiduels en phase S est significativement différente entre les cellules HeLa transfectées avec un siRNA NT, et celles transfectées par des siRNA dirigés pour chaque protéine sélectionnée. **, $p < 0.01$.

Effet de la déplétion des partenaires potentiels de XPA sur la survie cellulaire

Il était important d'étudier la chimiosensibilité et la radiosensibilité des cellules après diminution de l'expression des partenaires potentiels de XPA. Pour cela, nous avons évalué la survie clonogénique après traitement avec différents agents génotoxiques des HeLa sous-exprimant les partenaires potentiels de XPA. Les agents génotoxiques choisis sont le CDDP (6mg/mL), les UVC (7,5J) et les radiations ionisantes (4 Gy). Ces doses étaient estimées idéales pour la réalisation des tests de survie vu qu'elles permettent 15% de survie des HeLa transféctées par un siRNA non spécifique. Ainsi, une diminution ou une augmentation de la survie après traitement avec ces fortes doses sera facilement visualisée dans les cellules transféctées par des siRNA dirigés pour chaque protéine sélectionnée.

Le résultat obtenu montre que la majorité des partenaires potentiels de XPA ne régulent pas la survie cellulaire après traitement avec cisplatine (Figure 8). Il reste qu'une réduction de presque 50% dans le taux de survie a été observée après la déplétion des protéines WAPL, JARID, REST et Rad50.

L'irradiation aux UV n'a pas non plus permis d'observer, comme on s'y attendait, une sensibilité après déplétion des protéines SMC1, SMC3, WAPL, Rad21 et MRE11 pour lesquelles on avait constaté un léger défaut dans la réparation en phase-S.

Pour ce qui est des radiations ionisantes, la déplétion de SMC1 et SMC3 a permis un pourcentage de survie, respectivement de 7 et 8% . Ce résultat était attendu du fait que plusieurs études ont démontré l'implication des cohésines dans la recombinaison homologue. PRDX1 et PRDX2 induisent une radiosensibilité. Les protéines du complexe MRN i.e., MRE11, Rad50 et NBS1 n'induisent pas de sensibilité aux radiations

ionisantes (Lamarche, Orazio, & Weitzman, 2010; Williams et al., 2009). Ce résultat n'était pas attendu, vu le rôle majeur joué par ces protéines dans la recombinaison homologue.

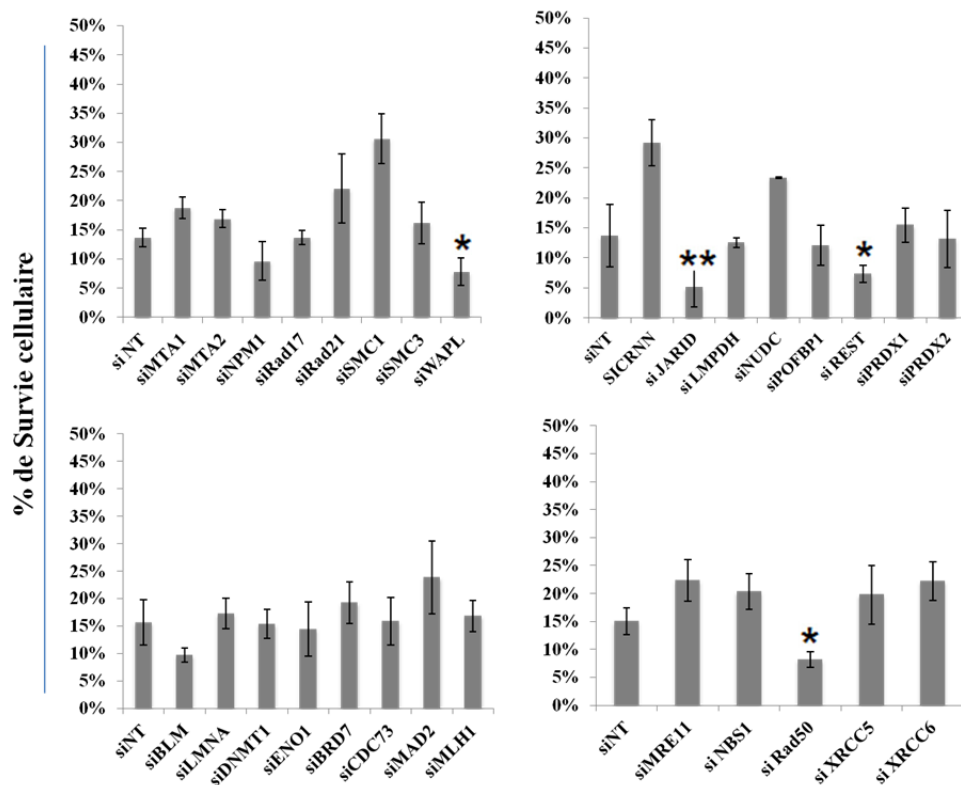


Figure 8 : La survie clonogénique après traitement au cisplatine des cellules HeLa déplétées des partenaires potentiels de XPA. La diminution de l'expression des partenaires potentiels de XPA a été réalisée après transfection des cellules HeLa avec des siRNA (smartpool). Par la suite, ces cellules ont été traitées avec 6mg/mL de cisplatine pendant 1h à 37°C. Le pourcentage de survie a été calculé après incubation des cellules pendant 2 semaines. Le résultat représente la moyenne géométrique des pourcentages de survie en triplicata. *, $p < 0.05$ associée à un test T de Student à savoir si le % de survie cellulaire est significativement différent entre les cellules HeLa transfectées avec un siRNA NT, et celles transfectées par des siRNA dirigés pour chaque protéine sélectionnée. **, $p < 0.01$.

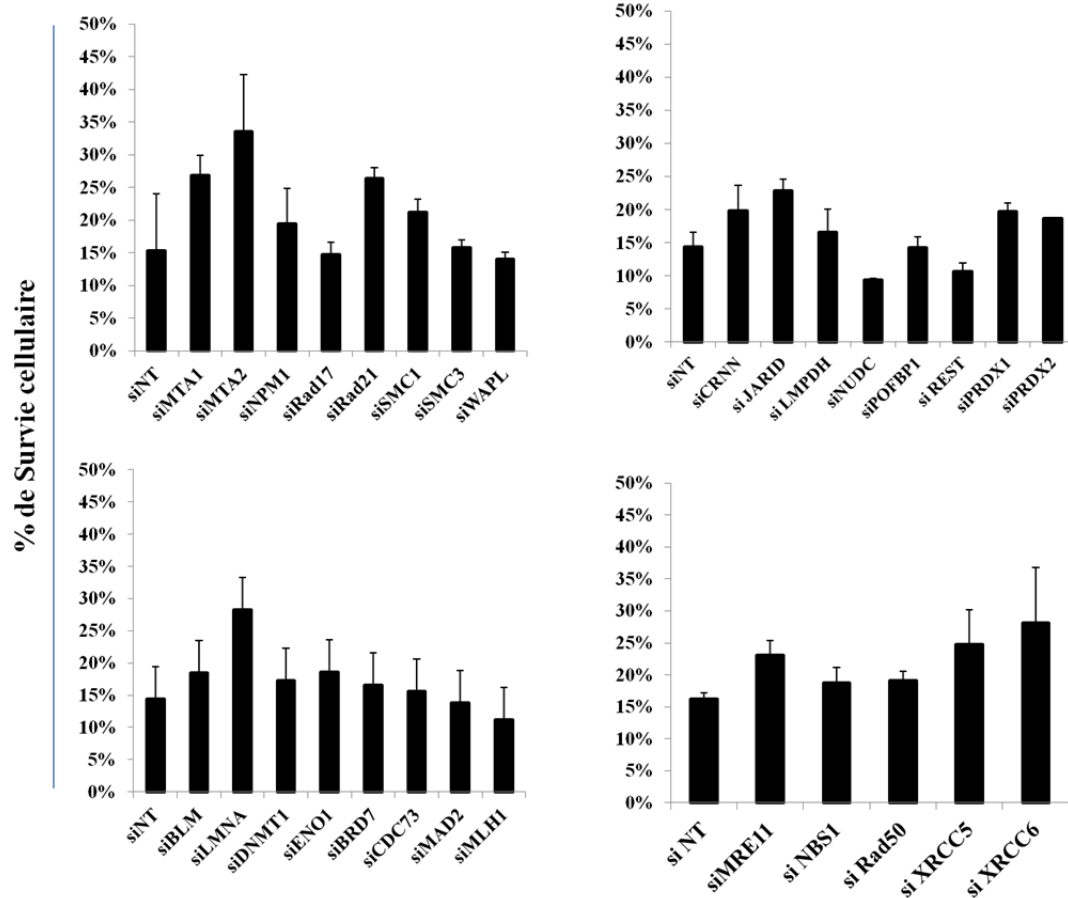


Figure 9: La survie clonogénique après irradiation aux UVC des cellules HeLa déplétées des partenaires potentiels de XPA. La diminution de l'expression des partenaires potentiels de XPA a été réalisée après transfection des cellules HeLa avec des siRNA (smartpool). Par la suite, ces cellules ont été irradiées avec $7,5\text{J/m}^2$ d'UVC. Le pourcentage de survie a été calculé après incubation des cellules pendant 2 semaines. Le résultat représente la moyenne géométrique des pourcentages de survie en triplicata.

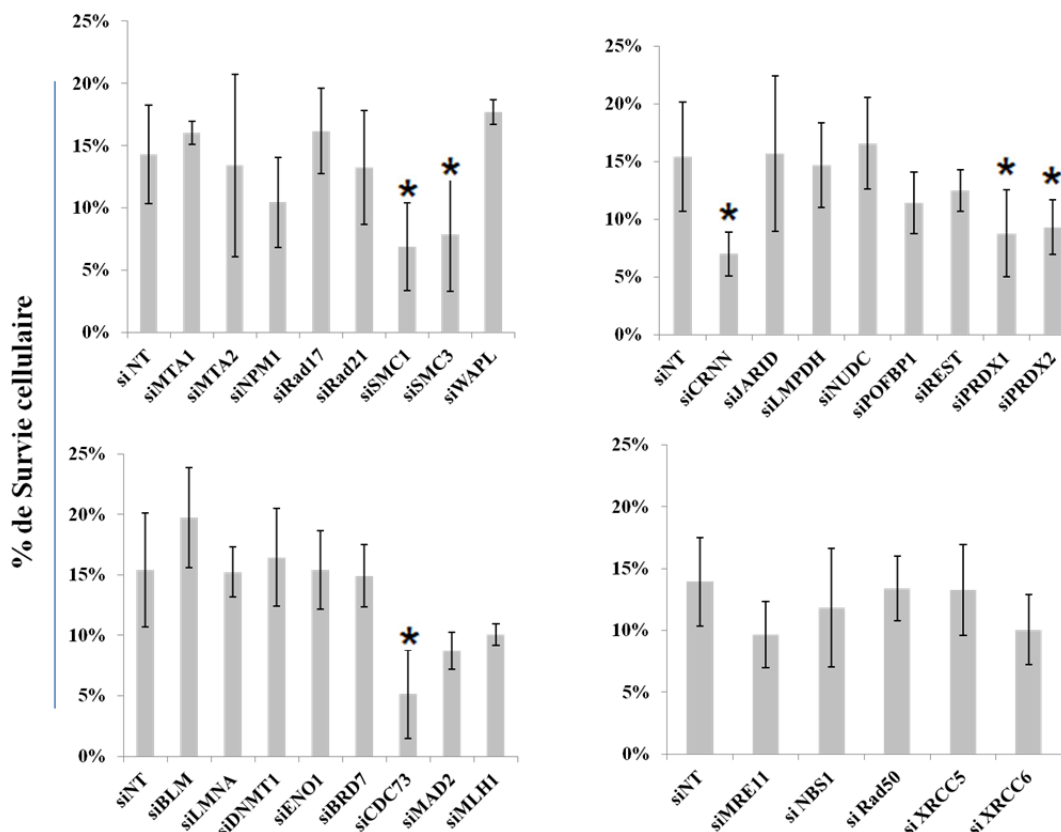


Figure 10 : La survie clonogénique après irradiation à 4Gy de rayons γ des cellules HeLa déplétées des partenaires potentiels de XPA. La diminution de l'expression des partenaires potentiels de XPA a été réalisée après transfection des cellules HeLa avec des siRNA (smartpool). Par la suite, ces cellules ont été irradiées avec 4GY de rayons γ . Le pourcentage de survie a été calculé après incubation des cellules pendant 2 semaines. Le résultat représente la moyenne géométrique des pourcentages de survie en triplicata. *, $p < 0.05$ associée à un test T de Student à savoir si le % de survie cellulaire est significativement différent entre les cellules HeLa transfectées avec un siRNA NT, et celles transfectées par des siRNA dirigés pour chaque protéine sélectionnée

Le rôle des cohésines et des protéines du complexe MRN dans la NER

Afin de confirmer le rôle potentiel des protéines SMC1, SMC3, WAPL, RAD21 et MRE11 dans la NER, un autre test de réparation était indispensable. Cette fois-ci, le taux des 6-4 PP réparées a été défini après la déplétion des protéines dans des cellules plus stables génétiquement ``les cellules primaires du poumon LL`` à 3h et 6h après irradiation aux UVC. Afin de voir si une diminution de l'expression de ces protéines

allait freiner le processus de réparation ou le rendre déficient; alors que théoriquement à 6h post UV, tous les 6-4PP sont réparés dans les cellules non déficientes dans la NER.

Nous avons commencé par effectuer des immunobuvardages pour confirmer l'effet des siRNA de SMC1 et SMC3, illustré dans la Figure (11 a, b) par une diminution assez importante de l'expression de SMC1 et SMC3. Il est important de rappeler qu'une déplétion de SMC1 ne réduit pas l'expression de SMC3. Par contre, une déplétion de SMC3 permet une réduction de l'expression de SMC1. Le mécanisme par lequel SMC3 stabilise SMC1 n'est pas connu (Laugsch, Seebach, Schnittler, & Jessberger, 2013). Le résultat de la réparation des 6-4PP (Figure 11d) montre clairement que 3h après l'irradiation des cellules déplétées en SMC1 et celles déplétées en SMC3, seulement 70% des 6-4 PP sont réparés contre 90% dans les cellules transfectées avec un siRNA non spécifique. Ce résultat confirme celui du criblage. Cependant, après 6h d'irradiation, la totalité des 6-4PP sont réparés dans les cellules déplétées en SMC1, en SMC3 tout comme les cellules transfectées avec un siRNA non spécifique. Le même résultat a été obtenu dans trois expériences indépendantes. Nous concluons donc que la déplétion des protéines SMC1 et SMC3 semble retarder le processus de réparation.

Concernant l'expression de Rad21 (Figure 12a), une faible diminution est constatée avec une réduction dans la réparation des 6-4PP en phase-S où seulement 68% des 6-4PP sont réparés, même après 6h de temps d'irradiation (Figure 12d). Dans la figure (Figure 12b) la déplétion de WAL est insuffisante, mais la réparation des 6-4PP durant les phases G1 et G2 est totale, alors qu'elle ne l'était pas dans la phase-S après 6h de temps. D'après ces résultats, il est possible de penser que Rad21 et WAPL jouent un rôle dans la régulation de la NER durant la phase-S du cycle cellulaire.

Pour ce qui est des protéines du complexe MRN, après une forte déplétion de Rad50 (figure 13b), les cellules réparent la totalité des 6-4PP après 3h d'irradiation aux UVC (Figure 13e). Le même résultat est observé après 3 expériences indépendantes, ce qui nous permet de conclure que Rad50 ne régule pas la NER. Pour MRE11 et NBS1, (figure 13c, d), les tests de réparation n'ont pas été réalisés, car il serait impossible de tirer une conclusion sur les rôles potentiels de MRE11 et NBS1 dans la NER. En fait, il n'était pas possible d'obtenir une diminution significative de l'expression de ces protéines dans les cellules LL (Figure 13 c,d). Pour remédier à ce problème, des cellules déficientes en MRE11 et NBS1 seront utilisées dans les prochaines expériences.

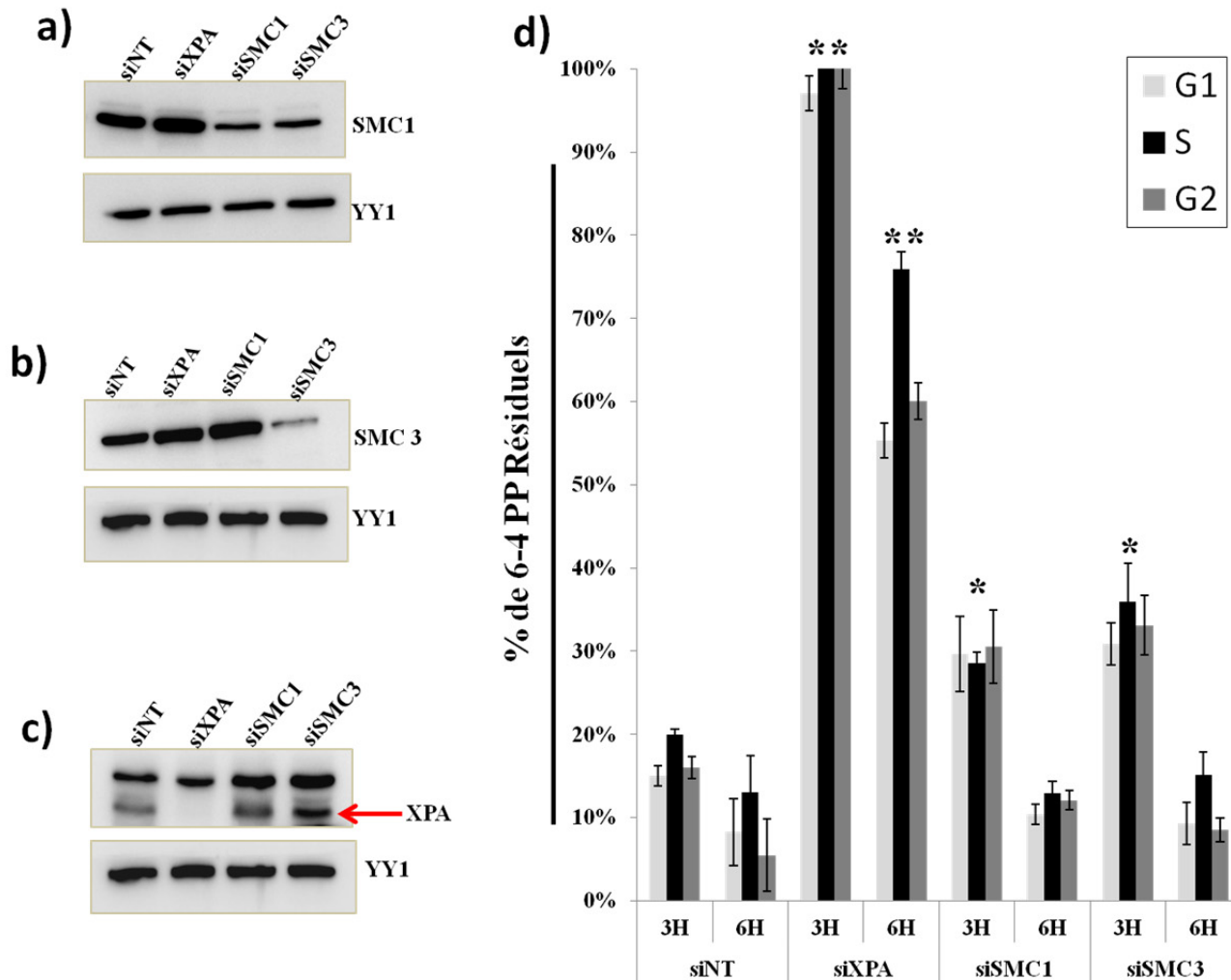


Figure 11: Cinétique de réparation des 6-4PP dans les cellules HeLa irradiées à 25J d'UVC après déplétion de SMC1 et SMC3. Les figures a), b), c) représentent des immunobuvardages montrant le niveau de SMC1, SMC3 et XPA respectivement après déplétion dans les cellules HeLa. d) Le pourcentage des 6-4PP non réparés à 3h et 6h de temps après irradiation des cellules déplétées de XPA, SMC1 et SMC3, les cellules transfectées avec un siNT sont utilisées comme cellules contrôles. *, p < 0.05 associée à un test T de Student à savoir si la quantité des 6-4PP résiduels est significativement différente entre les cellules HeLa transfectées avec un siRNA NT, et celles transfectées par des siRNA dirigés pour chaque protéine sélectionnée après 3h et 6h d'irradiation. **, p < 0.01.

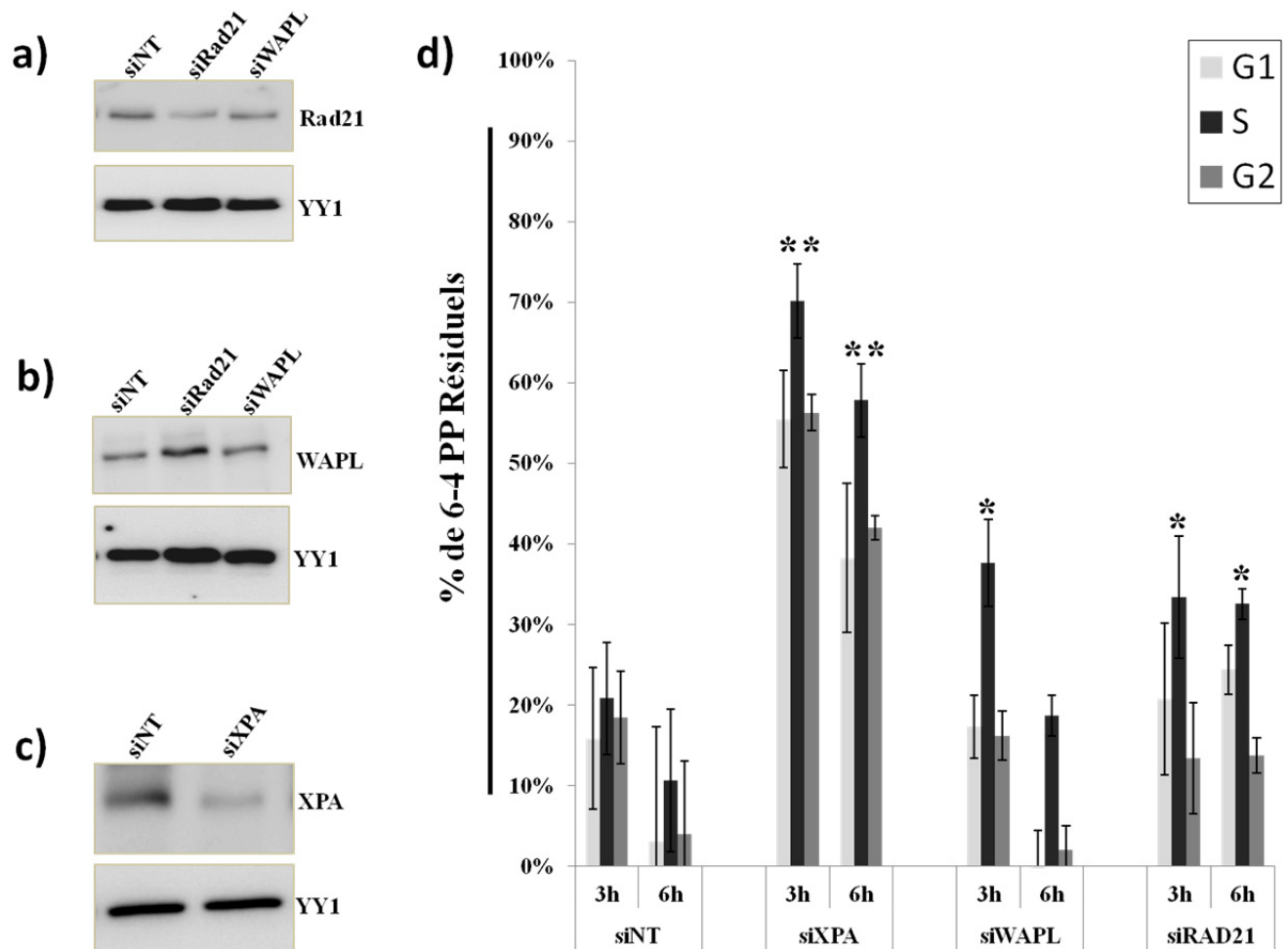


Figure 12 : Pourcentage des 6-4PP réparés après 3h et 6h de temps d'irradiation des cellules HeLa déplétées de WAPL et Rad21. Les figures a), b), et c) montrent respectivement une diminution de l'expression de XPA, WAPL et Rad21 après transfection des cellules HeLa avec des siRNA dirigées contre chaque protéine respective. d) le pourcentage des 6-4 PP résiduels a été déterminé dans les cellules déplétées de XPA, WAPL et Rad21. *, $p < 0.05$ associée à un test T de Student à savoir si la quantité des 6-4PP résiduels en phase S est significativement différente entre les cellules HeLa transfectées avec un siRNA NT, et celles transfectées par des siRNA dirigés pour chaque protéine sélectionnée après 3h et 6h d'irradiation. **, $p < 0.01$.

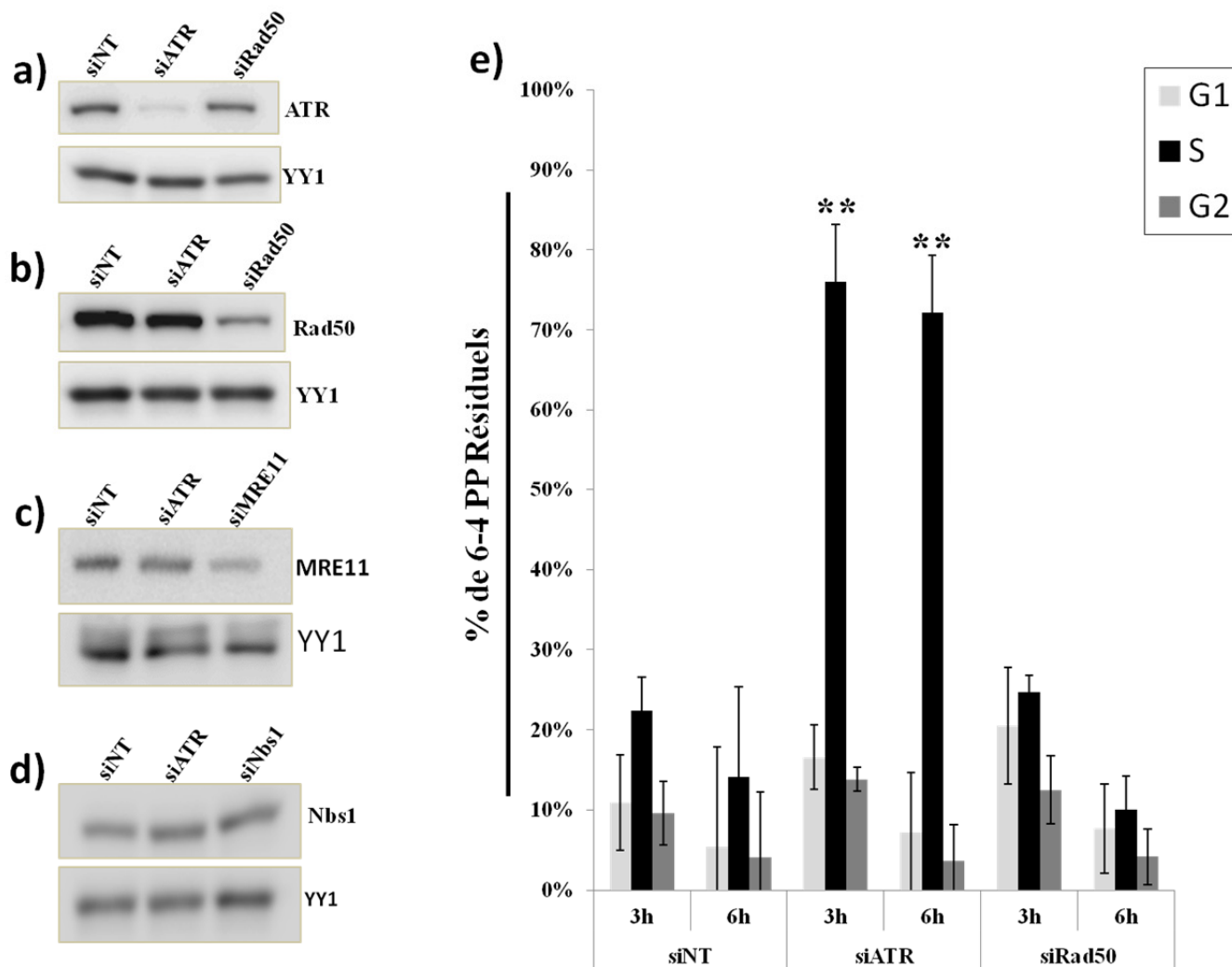


Figure 13 : Taux de réparation des 6-4 PP après irradiation des cellules déplétées de Rad50 avec 25J/m^2 d'UVC. Les figures a), b), c) et d) représentent une diminution de l'expression d'ATR, Rad50, MRE11 et Nbs1 respectivement dans les cellules HeLa suite à une transfection aux siRNA. e) Le taux de réparation des 6-4PP a été déterminé dans les cellules HeLa sous exprimant Rad50 après 3h et 6h de temps d'irradiation aux UVC. . **, $p < 0.01$ associée à un test T de Student à savoir si la quantité des 6-4PP résiduels en phase S est significativement différente entre les cellules HeLa transfectées avec un siRNA NT, et celles transfectées par des siRNA dirigés pour chaque protéine sélectionnée après 3h et 6h d'irradiation.

Validation des nouvelles interactions par immunoprécipitation

Vu que les protéines SMC1, SMC3, Rad21, WAPL et MRE11 semblent réguler la NER, il était essentiel de confirmer leur interaction avec XPA. Pour ce faire, une co-immunoprécipitation a été réalisée via des billes Flag à partir de l'extrait total des cellules HeLa-S exprimant XPA-Flag-HA, en présence et en absence de CDDP. Après précipitation de XPA, le résultat révèle (Figure 14) que les partenaires déjà connus (RPA et XPF) sont présents dans les deux conditions (+/- CDDP). Quant à YY1, il n'est pas un partenaire de XPA, mais il a été utilisé comme contrôle pour confirmer l'absence de contaminants dans la IP. SMC1, SMC3, Rad21 et WAPL n'ont pas été co-purifiées avec XPA (Figure 14a). En ce qui concerne les protéines du complexe MRN, Nbs1 n'a pas été coprécipité avec XPA ni en présence ni en absence de cisplatine. À l'opposé, bien que MRE11 ait été détecté dans les deux conditions (+/- CDDP) tout comme ce qui a été observé dans le complexe à grande échelle; on ne peut pas confirmer l'existence d'une interaction directe entre XPA et MRE11. D'autres expériences seront nécessaires pour valider cette interaction. De son côté, RAD50 a été retrouvée dans les cellules HeLa-S non transfectées et dans les HeLa-S-XPA-Flag-HA (+/-CDDP). RAD50 est probablement un faux positif en raison de sa déplétion qui n'a eu aucun effet sur la NER.

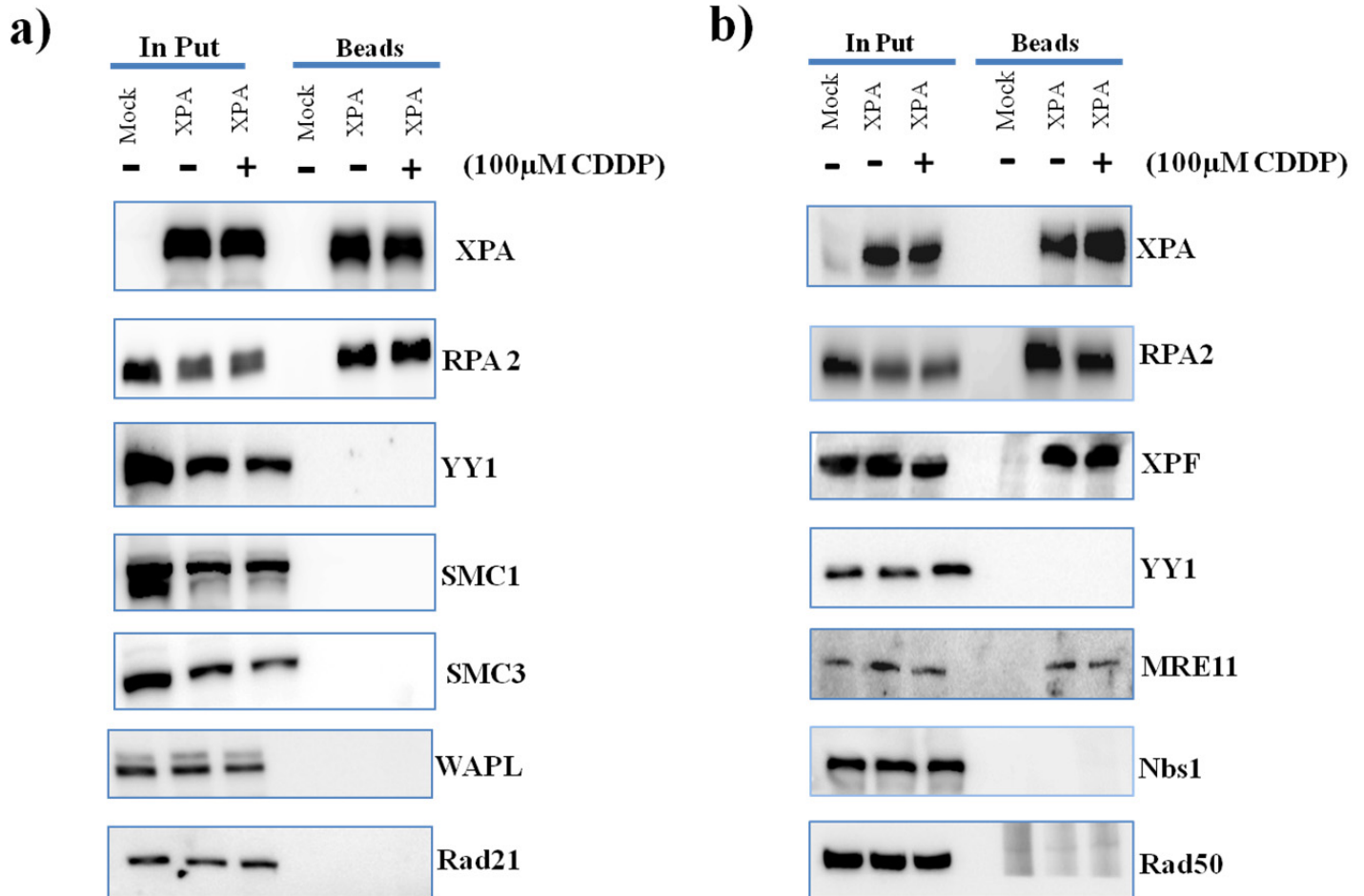


Figure 14 : Co-immunoprécipitation des protéines sélectionnées en présence et en absence de cisplatine. L'extrait total des cellules HeLa-S-XPA-Flag-HA a été immunoprécipité par des billes Flag. Les protéines immunoprécipitées ont été analysées par immunobuvardage. **a)** Résultat pour le complexe des cohésines. **b)** Résultat pour les protéines du complexe MRN.

Discussion

Rappel du projet

La réparation par excision de nucléotides (NER) est une voie très importante dans l'élimination d'une multitude de lésions endommageant l'ADN. Un dysfonctionnement de la NER induit l'apparition de troubles distincts : La xérodermie pigmentaire (XP), le syndrome de Cockayne (CS), le syndrome de sensibilité aux UV(UV^SS) ainsi que la trichothiodystrophie (TTD). Les patients atteints de l'un de ces syndromes souffrent en plus de sensibilité aux UV et à une prédisposition au développement du cancer de la peau. Ces patients peuvent souffrir et à des degrés divers de neurodégénérescence. La diversité des symptômes cliniques observés dans ces syndromes laisse suggérer que, les facteurs de la NER sont également importants dans des processus biologiques indirectement associés à leur rôle dans la NER. Certaines études prétendent que ces facteurs effectuent d'autres fonctions au-delà de leur rôle dans la NER. Ils sont soupçonnés jouer un rôle potentiel dans la transcription (Singh, Compe, Le May, & Egly, 2015), le remodelage de la chromatine lors de la transcription en absence de dommage à l'ADN (Le May et al., 2010), la réparation des dommages causant une oxydation de l'ADN (Arbault et al., 2004) et dans le fonctionnement mitochondrial (Fang et al., 2014). Cependant, il n'existe aucun mécanisme précis qui explique cette hétérogénéité clinique observée chez les patients déficients en NER.

Dans l'optique de trouver de nouvelles pistes d'explication des phénotypes observés lors des syndromes liés à une déficience de la NER, nous avons réalisé une purification en tandem d'affinité à grande échelle, couplée à une analyse par

spectrométrie de masse (LC-MS/MS) des protéines nucléaires liées à XPA en présence et en absence de stress cellulaire. Ce facteur a été choisi du fait de la sévérité des symptômes neurologiques observés chez les patients XP-A auxquels aucune explication n'a encore été trouvée.

Expression de XPA-Flag-HA

Dans le but de trouver de nouveaux partenaires à XPA, nous avons commencé par faire exprimer cette protéine dans les cellules HeLa-S après l'avoir doublement marquée à Flag et HA. Le résultat de l'immunofluorescence a révélé la présence de XPA-Flag-HA uniquement au niveau des noyaux (Figure 4). Or, des études ultérieures avaient montré qu'en absence de stress, XPA se retrouve dans le cytoplasme durant les phases G1 et S du cycle cellulaire, alors qu'elle n'est présente principalement que dans le noyau au cours de la phase G2 (Z. Li, Musich, Cartwright, Wang, & Zou, 2013). Il aurait été intéressant de réaliser une immunofluorescence pour des cellules synchronisées dans les différentes phases du cycle cellulaire afin de confirmer la localisation de XPA-Flag-HA dans chaque phase et de vérifier la localisation de XPA endogène pour voir s'il y a une différence dans la localisation cellulaire entre XPA endogène et XPA recombinante.

Les partenaires protéiques de XPA

Après avoir exprimé XPA-Flag-HA dans les cellules HeLa-S, nous avons procédé à l'identification de ses partenaires protéiques en combinant la spectrométrie de masse en tandem à chromatographie liquide (LC-MS/MS) à une immunoprécipitation en tandem d'affinité. Il s'agit de la première étude réalisée dans un aussi large spectre, en présence et en absence de dommage à l'ADN. L'avantage de cette technique c'est qu'elle permet

d'identifier les partenaires d'interaction sans connaissance préalable du complexe protéique. De plus, une double purification permet d'éliminer les interactions non spécifiques.

Le résultat de la spectrométrie de masse a fourni une liste très étendue des partenaires de XPA en présence et en absence de traitement (+/- CDDP) avec plus de 400 protéines. La majorité des protéines retrouvées étaient des protéines des autres voies de réparation, comme les protéines de la recombinaison homologue qui étaient présentes avec un nombre important de peptides: MRE11, Nbs1, Rad50, XRCC5, XRCC6, SMC1, SMC3, ainsi que les protéines de réparation des mésappariements tels que Mlh1, MSH2 et MSH6. Apparemment, les voies de réparation ne sont pas vraiment séparées, mais ce sont plutôt les protéines d'une voie donnée qui se retrouvent dans une autre voie de réparation. Le nombre très élevé en protéines retrouvées dans le complexe XPA suppose la présence de plusieurs faux positifs, vu l'impossibilité que XPA soit impliquée dans un potentiel aussi important de complexes protéiques. Il est possible qu'un bon nombre de protéines recouvertes soient dues à une contamination par les acides nucléiques. Il aurait été ainsi intéressant de traiter les extraits protéiques avec des nucléases, ou bien à les soumettre aux ultrasons avant de réaliser la co-IP, pour éliminer les acides nucléiques contaminant les échantillons et donner ainsi plus de spécificité aux résultats. Cependant, la majorité des partenaires déjà connus de XPA sont ressortis, en l'occurrence RPA1, RPA2, RPA3, TFIIH, PARP1, XPF, Rad23, XPG, ERCC1 et XPC. Toutefois, ATR n'a pas été retrouvé dans le complexe XPA ni en présence ni en absence de CDDP, alors qu'il a été déjà montré que durant la phase-S, XPA est transloquée vers le noyau suite à son interaction avec importin α -4 d'une manière qui dépend d'ATR (Z. Li et al., 2013).

On suppose qu'ATR n'a pas été retrouvée vu que cette interaction a lieu en phase-S et que le complexe a été purifié à partir de cellules asynchrones. De plus, si l'interaction ATR-XPA est nécessaire pour la translocation d'XPA vers le noyau, dans notre cas nous avons constaté, par immunofluorescence, que XPA-Flag-HA est présente uniquement dans le noyau (Figure 4). On présume donc que l'interaction XPA-ATR n'a pas eu lieu vu que XPA-Flag-HA est déjà dans le noyau. Pourtant, importin α -4 a été retrouvée dans le complexe XPA, ce qui suggère que probablement l'interaction XPA-ATR est transitoire, c'est pourquoi elle n'a pas été retrouvée dans la purification ou peut être qu'à 3h post CDDP, il n'est pas possible de voir l'interaction. Cependant, pourquoi importin α -4 est présente dans le complexe XPA si XPA-Flag-HA est déjà dans le noyau? Cela peut s'expliquer par le fait que XPA forme un homo-dimère avec elle-même (Yang, Liu, Mao, Zhang, & Zou, 2002). Donc, il est possible que XPA-Flag-Ha forme un homo-dimère avec XPA endogène, alors que cette dernière interagit avec importin α -4 pour assurer sa translocation vers le noyau en phase-S du cycle cellulaire, surtout que importin α -4 est présente par un petit nombre de peptides.

Il a déjà été démontré aussi qu'ATR phosphoryle XPA au niveau de la serine 196 (S196), ce qui augmente la viabilité cellulaire après irradiation aux UV (Wu et al., 2006). En outre, la phosphatase oncogénique WIP1 induit une déphosphorylation de XPA au niveau de la (S196) induisant une diminution de la NER (Nguyen et al., 2010). WIP1 n'a pas été retrouvé dans la purification, c'est une autre protéine de la même famille de WIP1, présente spécifiquement après traitement au CDDP dite PPM1G, de la famille des PP2C serine/ thréonine phosphatase avec un nombre faible en peptides (3).

Dans les deux conditions, la protéine E3 ubiquitine- ligase HERC2 n'a pas été trouvée dans le complexe XPA. L'ubiquitination de XPA par HERC2 induit sa dégradation. Cependant, après un dommage à l'ADN, la phosphorylation de XPA par ATR permet une dissociation de HERC2 de XPA, par conséquent sa stabilisation. La protéine centrosomique Cep164, ainsi que la déacetylase SIRT1 n'ont pas été retrouvées non plus. Il est possible que ces protéines soient impliquées spécifiquement dans la réponse aux dommages à l'ADN par les UV, car l'interaction XPA-HERC2, XPA-Cep164, ainsi que l'interaction XPA-SIRT1 ont été mises en évidence spécifiquement après irradiation aux UV (Fan & Luo, 2010; Pan & Lee, 2009).

Résultat du criblage

Pour donner plus de spécificité à nos résultats, nous avons décidé de sélectionner une trentaine de protéines pour réaliser un criblage. Le choix des protéines était basé sur la présence d'un nombre élevé de peptides, leur présence dans la catégorie après traitement et sur l'augmentation du nombre de peptides après traitement. De plus, toutes les protéines qui ont été choisies ne sont pas connues comme de potentiels partenaires de XPA. Les résultats des tests de réparation ont révélé que la majorité des protéines sélectionnées ne régulaient pas la NER, à l'exception de MRE11, RAD21, SMC1, SMC3 et probablement WAPL. Le rôle des protéines du complexe MRN dans la réponse aux dommages à l'ADN après UV a déjà été mis en évidence (Olson, Nievera, Lee, Chen, & Wu, 2007; Zhong, Bryson, Eckersdorff, & Ferguson, 2005). Le complexe MRN est nécessaire pour la médiation du point de contrôle en phase S après traitement aux UV, parce qu'il facilite l'activation d'ATR au niveau des fourches de réplication bloquées. Il est également nécessaire pour la phosphorylation de RPA32 par ATR pour faire la

médiation du point de contrôle en phase-S après irradiation aux UV. Cependant, son rôle dans le processus de réparation par excision des nucléotides n'a pas encore été démontré, c'est pourquoi nous avons décidé de déterminer l'effet de la diminution de l'expression des protéines MRN sur la NER. Le criblage a montré qu'après diminution de l'expression de MRE11, les HeLa présentaient un léger défaut dans la réparation des 6-4PP en phase-S. Ce résultat est en accord avec ce qui a déjà été démontré, du fait que les protéines du complexe MRN sont essentielles à l'activation d'ATR durant la phase-S du cycle cellulaire, et que ATR est nécessaire dans la NER exclusivement durant la phase-S (Auclair et al., 2008). Il serait donc probable que MRE11 soit aussi nécessaire pour la NER, exclusivement durant la phase-S. En revanche, la diminution de l'expression de MRE11 par les siRNA n'a pas été significative, ceci a été confirmé par immunobuvardage et par le fait que les cellules traitées par un siRNA de MRE11 n'étaient pas sensibles aux radiations γ . Ainsi, il serait plus intéressant de connaître le taux de réparation des 6-4PP dans les cellules déficientes en MRE11 les ``*ATLD cells*`` des patients atteints d'ataxie télangiectasie, afin de confirmer si MRE11 est nécessaire dans la réparation des 6-4PP par la NER exclusivement en phase-S, surtout que l'immuno-précipitation de XPA a révélé la présence de MRE11 dans son complexe.

En ce qui concerne les autres protéines (Rad50 et NBS1) du complexe MRN; après une diminution significative de l'expression de Rad50, aucun effet n'a été observé sur la réparation des 6-4PP. Pour NBS1, la diminution de son expression n'était pas significative, et de ce fait, il n'est toujours pas possible de tirer une conclusion sur le rôle de cette protéine dans la NER. Il serait intéressant de vérifier la réparation des 6-4 PP

dans les cellules déficientes en NBS1 et les (GM07166) des personnes atteintes du syndrome de Nimègue.

Quant aux protéines du complexe des cohésines SMC1, SMC3, Rad21 et WAPL, leur rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN causés par les UV n'a pas encore été prouvé. Il a seulement été suggéré que la cohésion des chromatides-sœurs supprime la recombinaison induite par les UV en phase G2 (Covo, Ma, Westmoreland, Gordenin, & Resnick, 2012; Covo, Westmoreland, Gordenin, & Resnick, 2010). Il a aussi été montré qu'une mutation de SCC1 l'homologue de Rad21 chez *Schizosaccharomyces pombe*, rendait les cellules hypersensibles aux UV (Birkenbihl & Subramani, 1992). Dans notre étude nous avons observé une diminution significative dans l'expression de SMC1 et SMC3 et nous avons aussi confirmé le résultat déjà publié où il a été montré qu'une diminution de SMC3 permettait une réduction dans l'expression de SMC1, alors qu'une diminution de SMC1 ne permettait pas une réduction dans l'expression de SMC3. On a aussi conclu qu'une diminution de l'expression des cohésines SMC1 et SMC3 ne rendait pas les cellules déficientes dans la NER, cependant ces cellules causaient un ralentissement dans le processus de réparation des 6-4PP. En revanche, même si la diminution de l'expression de Rad21 et WAPL n'était pas significative, il y avait quand même un léger défaut en phase-S. Toutefois, ces cellules n'étaient pas sensibles aux UV tel qu'il a été observé chez la levure, peut être que parce que la déplétion n'était pas suffisante pour déceler cette hypersensibilité. De plus, aucune de ces protéines (Rad21 et WAPL) n'a été retrouvée dans le complexe de XPA à partir des co-IP. Cela laisse suggérer que peut être ces interactions sont faibles et qu'il n'est pas possible de les voir à

partir des protéines endogènes. Ainsi, il serait intéressant de faire des co-surexpressions entre XPA et la protéine recherchée pour pouvoir confirmer les interactions.

On se demande pourquoi il y a une forte présence de protéines de la recombinaison homologue dans le complexe XPA, en l'occurrence, les protéines du complexe MRN ainsi que les protéines du complexe des cohésines, sachant que le complexe XPA a été isolé après traitement des cellules au CDDP. Il se pourrait que les interactions observées par spectrométrie soient spécifiques au CDDP, car le cisplatine induit aussi des liaisons intercaténaire qui peuvent produire des cassures double brin et qui sont ainsi réparés par la recombinaison homologue. Dans ces conditions, la question à poser serait l'inverse, c.à.d. quel rôle joue XPA dans la recombinaison homologue? Pour vérifier cette hypothèse, il serait pertinent de vérifier la sensibilité aux radiations ionisantes des cellules déficientes en XPA par des tests de survie. Et par immunofluorescence, vérifier la formation des foyers de Rad51.

Conclusion

XPA est une protéine majeure de la réparation par excision des nucléotides. Comment cette protéine provoque-t-elle des symptômes neurologiques chez les patients XP-A? La question reste posée. Aucune étude n'a encore pu répondre à cette question. Dans notre étude, le but premier était de montrer que la protéine XPA possède d'autres partenaires protéiques que ceux qui sont déjà connus. Effectivement, le résultat de la purification des complexes d'XPA en présence et en absence de stress cellulaire a montré la présence de plusieurs protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN, dans la machinerie transcriptionnelle, la réplication, le remodelage de la chromatine, le cycle cellulaire ainsi que des protéines du métabolisme. Il semble que XPA possède bel et bien d'autres fonctions en dehors de la NER. De plus, la présence en nombre important de peptides des protéines de la réparation par recombinaison homologue avait attiré notre attention. Ces protéines, notamment MRE11 a été retrouvée en grand nombre dans les deux complexes de XPA (-/+ CDDP). Or, jusqu'à présent aucune étude n'a montré le rôle de MRE11 dans la NER ni la possibilité que MRE11 interagisse avec XPA. Ce résultat qui a été confirmé par co-immunoprécipitation est très intéressant, car cela suggère fortement que MRE11 interagisse avec XPA. Cependant, d'autres expériences sont nécessaires pour valider cette interaction et déterminer sa fonction.

Les limites de l'étude

Il est clair que la limite majeure de cette étude est le nombre élevé des protéines retrouvées dans les complexes XPA. En effet, mis à part la purification par les billes, rien ne prouvait qu'il s'agisse effectivement d'interactions directes. De plus, la purification des complexes protéiques sans traitement aux nucléases n'excluait pas la possibilité que ces interactions soient dues tout simplement aux acides nucléiques contaminants ou aux protéines liant les acides nucléiques présents lors de la purification. Il est alors très difficile de donner une direction aux résultats et de poser des hypothèses quant à l'implication de XPA dans un potentiel aussi large de complexes protéiques.

Par ailleurs, le fait d'utiliser les cellules HeLa-S comme modèle pour déterminer les partenaires protéiques de XPA pourrait faire de grandes différences entre les résultats *in vivo* versus les résultats *in vitro*. À cela s'ajoute la purification des complexes, non pas par XPA endogène, mais par XPA recombinante qui pourraient ne pas agir de la même manière au niveau cellulaire. Car, XPA recombinante était marquée avec les étiquettes Flag et HA qui probablement changeront sa conformation comparativement à XPA endogène. Et qui dit conformation différente dit partenaires différents.

De plus, l'utilisation du CDDP à la place des UV, même si le CDDP induit des lésions qui sont réparées par la NER et qui donc font appel à XPA, le CDDP permet la formation des adduits inter-caténaux qui sont réparés par la voie de réparation ICL (Voir introduction). Ainsi, le CDDP permet l'activation d'autres voies de signalisation cellulaire différemment des UV, et donc XPA serait dans un environnement cellulaire différent et aurait des partenaires différents. Un autre obstacle s'ajoute à cela, c'est la

concentration en CDDP choisie pour la purification des complexes. La concentration choisie était basée sur l'activation de Chk1, donc sur l'activation de la signalisation des dommages. Il se peut que cette concentration n'est pas optimale et que les dommages induits sont peu ou trop nombreux. Le profil des partenaires de XPA serait alors différent.

Finalement, nous avons rencontré des obstacles dans l'optimisation des conditions pour avoir une réduction significative de l'expression par siRNA des protéines sélectionnées. Le nombre de protéines étant élevé, cette étape a nécessité beaucoup de temps. De plus, l'utilisation d'un SmartPools de 3 siRNA a peut être eu des effets non spécifiques.

Expériences futures

Afin de consolider les résultats présentés dans ce mémoire, plusieurs travaux futurs doivent être réalisés.

Pour commencer, il serait intéressant de confirmer la localisation cellulaire de XPA versus XPA-Flag-HA, selon le cycle cellulaire en présence et en absence de dommage à l'ADN. Vu que nous avons constaté la localisation nucléaire de XPA-Flag-HA dans des cellules asynchrones, alors que des études antérieures avaient montré la localisation cytoplasmique de XPA en phase G1 et S, alors qu'en phase G2, XPA se retrouvait majoritairement dans le noyau.

Afin de valider l'interaction XPA-MRE11, il est impératif de refaire des co-immunoprécipitations en présence de nucléases afin de prouver que cette interaction n'est pas dépendante de l'ADN. De plus, il est nécessaire de réaliser une reverse co-immunoprécipitation, c.à.d. vérifier la présence de XPA dans le complexe de MRE11. De même, vérifier l'interaction XPA-MRE11 après dommage à l'ADN par les UV, car il se pourrait que l'interaction XPA-MRE11 soit spécifique aux dommages à l'ADN par le CDDP.

Il serait aussi important de vérifier si l'interaction XPA-MRE11 est dépendante d'ATR, en réalisant des co-IP dans des cellules traitées avec un inhibiteur d'ATR. Car, il a déjà été montré que : Après traitement aux UV, au niveau des fourches de réplication bloquées, le complexe MRN est nécessaire en amont d'ATR pour faciliter son activation (Olson et al., 2007). En parallèle, après traitement aux UV, la phosphorylation de XPA

médiée par ATR activée, améliore la stabilité de XPA en inhibant son ubiquitination par HERC2 qui conduit à sa dégradation par le système du protéosome (Wu et al., 2006).

D'autre part, vu qu'il n'était pas possible d'avoir une réduction significative de l'expression de MRE11 et NBS1 avec les siRNA, mesurer l'efficacité de réparation des 6-4PP dans les cellules déficientes en MRE11 (*ATLD cells*) ainsi que les déficientes en NBS1 (GM07166) serait très pertinent. Car, ça nous donnerait une idée claire sur le rôle potentiel de ces deux protéines dans la NER. Il est aussi important de mesurer le taux de réparation des CPD dans ces cellules sachant que les CPD sont la source majeure des cancers de la peau.

Les résultats présentés ici nous laissent suggérer que XPA joue un rôle dans la réparation par recombinaison homologue. Ceci reste quand même à vérifier en déterminant le recrutement de Rad51 par immunofluorescence dans les cellules déficientes en XPA provenant de patients XP-A.

Bibliographie

- Aamann, M. D., Muftuoglu, M., Bohr, V. A., & Stevnsner, T. (2013). Multiple interaction partners for Cockayne syndrome proteins: implications for genome and transcriptome maintenance. *Mech Ageing Dev*, *134*(5-6), 212-224. doi: 10.1016/j.mad.2013.03.009
- Aamann, M. D., Sorensen, M. M., Hvitby, C., Berquist, B. R., Muftuoglu, M., Tian, J., . . . Bohr, V. A. (2010). Cockayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane. *Faseb j*, *24*(7), 2334-2346. doi: 10.1096/fj.09-147991
- Allen, C., Ashley, A. K., Hromas, R., & Nickoloff, J. A. (2011). More forks on the road to replication stress recovery. *J Mol Cell Biol*, *3*(1), 4-12. doi: 10.1093/jmcb/mjq049
- An, R., Jia, Y., Wan, B., Zhang, Y., Dong, P., Li, J., & Liang, X. (2014). Non-enzymatic depurination of nucleic acids: factors and mechanisms. *PLoS One*, *9*(12), e115950. doi: 10.1371/journal.pone.0115950
- Andersen, P. L., Xu, F., & Xiao, W. (2008). Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res*, *18*(1), 162-173. doi: 10.1038/cr.2007.114
- Aparicio, T., Baer, R., & Gautier, J. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair (Amst)*, *19*, 169-175. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.03.014

- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugasawa, K., Kondoh, J., . . . Hanaoka, F. (2001). Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem*, 276(22), 18665-18672. doi: 10.1074/jbc.M100855200
- Arbault, S., Sojic, N., Bruce, D., Amatore, C., Sarasin, A., & Vuillaume, M. (2004). Oxidative stress in cancer prone xeroderma pigmentosum fibroblasts. Real-time and single cell monitoring of superoxide and nitric oxide production with microelectrodes. *Carcinogenesis*, 25(4), 509-515. doi: 10.1093/carcin/bgh046
- Arczewska, K. D., Tomazella, G. G., Lindvall, J. M., Kassahun, H., Maglioni, S., Torgovnick, A., . . . Nilsen, H. (2013). Active transcriptomic and proteomic reprogramming in the *C. elegans* nucleotide excision repair mutant xpa-1. *Nucleic Acids Res*, 41(10), 5368-5381. doi: 10.1093/nar/gkt225
- Auclair, Y., Rouget, R., Affar el, B., & Drobetsky, E. A. (2008). ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(46), 17896-17901. doi: 10.1073/pnas.0801585105
- Avkin, S., Sevilya, Z., Toubé, L., Geacintov, N., Chaney, S. G., Oren, M., & Livneh, Z. (2006). p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load. *Mol Cell*, 22(3), 407-413. doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.022
- Bartek, J., Bartkova, J., & Lukas, J. (2007). DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*, 26(56), 7773-7779. doi: 10.1038/sj.onc.1210881

- Bartek, J., & Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol*, *19*(2), 238-245. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.009
- Batista, L. F., Kaina, B., Meneghini, R., & Menck, C. F. (2009). How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res*, *681*(2-3), 197-208. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.09.001
- Bedez, F., Linard, B., Brochet, X., Ripp, R., Thompson, J. D., Moras, D., . . . Poch, O. (2013). Functional insights into the core-TFIIH from a comparative survey. *Genomics*, *101*(3), 178-186. doi: 10.1016/j.ygeno.2012.11.003
- Belanger, F., Rajotte, V., & Drobetsky, E. A. (2014). A majority of human melanoma cell lines exhibits an S phase-specific defect in excision of UV-induced DNA photoproducts. *PLoS One*, *9*(1), e85294. doi: 10.1371/journal.pone.0085294
- Bergink, S., Toussaint, W., Luijsterburg, M. S., Dinant, C., Alekseev, S., Hoeijmakers, J. H., . . . Vermeulen, W. (2012). Recognition of DNA damage by XPC coincides with disruption of the XPC-RAD23 complex. *J Cell Biol*, *196*(6), 681-688. doi: 10.1083/jcb.201107050
- Berquist, B. R., & Wilson, D. M., 3rd. (2012). Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Lett*, *327*(1-2), 61-72. doi: 10.1016/j.canlet.2012.02.001
- Berra, C. M., de Oliveira, C. S., Garcia, C. C., Rocha, C. R., Lerner, L. K., Lima, L. C., . . . Menck, C. F. (2013). Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. *Free Radic Biol Med*, *61*, 343-356. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.026

- Birkenbihl, R. P., & Subramani, S. (1992). Cloning and characterization of rad21 an essential gene of *Schizosaccharomyces pombe* involved in DNA double-strand-break repair. *Nucleic Acids Res*, *20*(24), 6605-6611.
- Botta, E., Nardo, T., Lehmann, A. R., Egly, J. M., Pedrini, A. M., & Stefanini, M. (2002). Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy. *Hum Mol Genet*, *11*(23), 2919-2928.
- Bradford, P. T., Goldstein, A. M., Tamura, D., Khan, S. G., Ueda, T., Boyle, J., . . . Kraemer, K. H. (2011). Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. *J Med Genet*, *48*(3), 168-176. doi: 10.1136/jmg.2010.083022
- Bradsher, J., Auriol, J., Proietti de Santis, L., Iben, S., Vonesch, J. L., Grummt, I., & Egly, J. M. (2002). CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol Cell*, *10*(4), 819-829.
- Branzei, D., & Foiani, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(3), 208-219. doi: 10.1038/nrm2852
- Brash, D. E. (2015). UV signature mutations. *Photochem Photobiol*, *91*(1), 15-26. doi: 10.1111/php.12377
- Busino, L., Chiesa, M., Draetta, G. F., & Donzelli, M. (2004). Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene*, *23*(11), 2050-2056. doi: 10.1038/sj.onc.1207394
- Caldecott, K. W. (2007). Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair (Amst)*, *6*(4), 443-453. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.10.006

- Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet*, 9(8), 619-631. doi: 10.1038/nrg2380
- Caldecott, K. W. (2014). DNA single-strand break repair. *Exp Cell Res*, 329(1), 2-8. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.027
- Cavalieri, E., Saeed, M., Zahid, M., Cassada, D., Snow, D., Miljkovic, M., & Rogan, E. (2012). Mechanism of DNA depurination by carcinogens in relation to cancer initiation. *IUBMB Life*, 64(2), 169-179. doi: 10.1002/iub.586
- Chang, D. J., & Cimprich, K. A. (2009). DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol*, 5(2), 82-90. doi: 10.1038/nchembio.139
- Chen, J., Bozza, W., & Zhuang, Z. (2011). Ubiquitination of PCNA and its essential role in eukaryotic translesion synthesis. *Cell Biochem Biophys*, 60(1-2), 47-60. doi: 10.1007/s12013-011-9187-3
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 40(2), 179-204. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.019
- Cimprich, K. A., & Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(8), 616-627. doi: 10.1038/nrm2450
- Clauson, C., Scharer, O. D., & Niedernhofer, L. (2013). Advances in understanding the complex mechanisms of DNA interstrand cross-link repair. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(10), a012732.
- Compe, E., & Egly, J. M. (2012). TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(6), 343-354. doi: 10.1038/nrm3350
- Cortat, B., Garcia, C. C., Quinet, A., Schuch, A. P., de Lima-Bessa, K. M., & Menck, C. F. (2013). The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in

- human cells. *Photochem Photobiol Sci*, 12(8), 1483-1495. doi: 10.1039/c3pp50023c
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., & Elledge, S. J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*, 294(5547), 1713-1716. doi: 10.1126/science.1065521
- Cottarel, J., Frit, P., Bombarde, O., Salles, B., Negrel, A., Bernard, S., . . . Calsou, P. (2013). A noncatalytic function of the ligation complex during nonhomologous end joining. *J Cell Biol*, 200(2), 173-186. doi: 10.1083/jcb.201203128
- Covo, S., Ma, W., Westmoreland, J. W., Gordenin, D. A., & Resnick, M. A. (2012). Understanding the origins of UV-induced recombination through manipulation of sister chromatid cohesion. *Cell Cycle*, 11(21), 3937-3944. doi: 10.4161/cc.21945
- Covo, S., Westmoreland, J. W., Gordenin, D. A., & Resnick, M. A. (2010). Cohesin Is limiting for the suppression of DNA damage-induced recombination between homologous chromosomes. *PLoS Genet*, 6(7), e1001006. doi: 10.1371/journal.pgen.1001006
- Curtin, N. J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, 12(12), 801-817. doi: 10.1038/nrc3399
- David, S. S., O'Shea, V. L., & Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147), 941-950. doi: 10.1038/nature05978
- de Lima-Bessa, K. M., Armelini, M. G., Chigancas, V., Jacysyn, J. F., Amarante-Mendes, G. P., Sarasin, A., & Menck, C. F. (2008). CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)*, 7(2), 303-312. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.11.003

- Deans, A. J., & West, S. C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*, *11*(7), 467-480. doi: 10.1038/nrc3088
- DiGiovanna, J. J., & Kraemer, K. H. (2012). Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J Invest Dermatol*, *132*(3 Pt 2), 785-796. doi: 10.1038/jid.2011.426
- Dijk, M., Typas, D., Mullenders, L., & Pines, A. (2014). Insight in the multilevel regulation of NER. *Exp Cell Res*, *329*(1), 116-123. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.010
- Ding, J., Ichikawa, M., Furukawa, A., Tomita, S., Tanaka, K., & Ichikawa, Y. (2001). Low synthesis of retinoic acid due to impaired cytochrome P450 1a1 expression in mouse xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*, *33*(6), 603-612.
- Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett*, *327*(1-2), 26-47. doi: 10.1016/j.canlet.2012.01.016
- Dizdaroglu, M. (2015). Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res*, *763*, 212-245. doi: 10.1016/j.mrrev.2014.11.002
- Dunkern, T. R., & Kaina, B. (2002). Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide excision repair-deficient Chinese hamster cells. *Mol Biol Cell*, *13*(1), 348-361. doi: 10.1091/mbc.01-05-0225
- El-Mahdy, M. A., Zhu, Q., Wang, Q. E., Wani, G., Praetorius-Ibba, M., & Wani, A. A. (2006). Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC. *J Biol Chem*, *281*(19), 13404-13411. doi: 10.1074/jbc.M511834200

- Erie, D. A., & Weninger, K. R. (2014). Single molecule studies of DNA mismatch repair. *DNA Repair (Amst)*, 20, 71-81. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.03.007
- Errico, A., & Costanzo, V. (2012). Mechanisms of replication fork protection: a safeguard for genome stability. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 47(3), 222-235. doi: 10.3109/10409238.2012.655374
- Faghri, S., Tamura, D., Kraemer, K. H., & Digiovanna, J. J. (2008). Trichothiodystrophy: a systematic review of 112 published cases characterises a wide spectrum of clinical manifestations. *J Med Genet*, 45(10), 609-621. doi: 10.1136/jmg.2008.058743
- Fan, W., & Luo, J. (2010). SIRT1 regulates UV-induced DNA repair through deacetylating XPA. *Mol Cell*, 39(2), 247-258. doi: 10.1016/j.molcel.2010.07.006
- Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Brace, L. E., Kassahun, H., SenGupta, T., Nilsen, H., . . . Bohr, V. A. (2014). Defective mitophagy in XPA via PARP-1 hyperactivation and NAD(+)/SIRT1 reduction. *Cell*, 157(4), 882-896. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.026
- Fanning, E., Klimovich, V., & Nager, A. R. (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res*, 34(15), 4126-4137. doi: 10.1093/nar/gkl550
- Feltes, B. C., & Bonatto, D. (2015). Overview of xeroderma pigmentosum proteins architecture, mutations and post-translational modifications. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 763, 306-320. doi: 10.1016/j.mrrev.2014.12.002
- Fischer, E. S., Scrima, A., Bohm, K., Matsumoto, S., Lingaraju, G. M., Faty, M., . . . Thoma, N. H. (2011). The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase

- architecture, targeting, and activation. *Cell*, *147*(5), 1024-1039. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.035
- Friedman, J. I., & Stivers, J. T. (2010). Detection of damaged DNA bases by DNA glycosylase enzymes. *Biochemistry*, *49*(24), 4957-4967. doi: 10.1021/bi100593a
- Fu, D., Calvo, J. A., & Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer*, *12*(2), 104-120. doi: 10.1038/nrc3185
- Fuss, J. O., & Tainer, J. A. (2011). XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase. *DNA Repair (Amst)*, *10*(7), 697-713. doi: 10.1016/j.dnarep.2011.04.028
- Ghosal, G., & Chen, J. (2013). DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Transl Cancer Res*, *2*(3), 107-129. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.01
- Gilljam, K. M., Muller, R., Liabakk, N. B., & Otterlei, M. (2012). Nucleotide excision repair is associated with the replisome and its efficiency depends on a direct interaction between XPA and PCNA. *PLoS One*, *7*(11), e49199. doi: 10.1371/journal.pone.0049199
- Gitiaux, C., Blin-Rochemaure, N., Hully, M., Echaniz-Laguna, A., Calmels, N., Bahi-Buisson, N., . . . Laugel, V. (2015). Progressive demyelinating neuropathy correlates with clinical severity in Cockayne syndrome. *Clin Neurophysiol*, *126*(7), 1435-1439. doi: 10.1016/j.clinph.2014.10.014

- Green, D. R., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, *333*(6046), 1109-1112. doi: 10.1126/science.1201940
- Gregan, J., Riedel, C. G., Petronczki, M., Cipak, L., Rumpf, C., Poser, I., . . . Nasmyth, K. (2007). Tandem affinity purification of functional TAP-tagged proteins from human cells. *Nat Protoc*, *2*(5), 1145-1151. doi: 10.1038/nprot.2007.172
- Greinert, R., Volkmer, B., Henning, S., Breitbart, E. W., Greulich, K. O., Cardoso, M. C., & Rapp, A. (2012). UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Res*, *40*(20), 10263-10273. doi: 10.1093/nar/gks824
- Groisman, R., Kuraoka, I., Chevallier, O., Gaye, N., Magnaldo, T., Tanaka, K., . . . Nakatani, Y. (2006). CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes Dev*, *20*(11), 1429-1434. doi: 10.1101/gad.378206
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., . . . Nakatani, Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell*, *113*(3), 357-367.
- Guillotin, D., & Martin, S. A. (2014). Exploiting DNA mismatch repair deficiency as a therapeutic strategy. *Exp Cell Res*, *329*(1), 110-115. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.07.004

- Hanasoge, S., & Ljungman, M. (2007). H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*, 28(11), 2298-2304. doi: 10.1093/carcin/bgm157
- Hannah, J., & Zhou, P. (2009). Regulation of DNA damage response pathways by the cullin-RING ubiquitin ligases. *DNA Repair (Amst)*, 8(4), 536-543. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.01.011
- Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*, 28(5), 739-745. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.015
- Harreman, M., Taschner, M., Sigurdsson, S., Anindya, R., Reid, J., Somesh, B., . . . Svejstrup, J. Q. (2009). Distinct ubiquitin ligases act sequentially for RNA polymerase II polyubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(49), 20705-20710. doi: 10.1073/pnas.0907052106
- Hayashi, M., Araki, S., Kohyama, J., Shioda, K., & Fukatsu, R. (2005). Oxidative nucleotide damage and superoxide dismutase expression in the brains of xeroderma pigmentosum group A and Cockayne syndrome. *Brain Dev*, 27(1), 34-38. doi: 10.1016/j.braindev.2004.04.001
- Hegde, M. L., Hazra, T. K., & Mitra, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res*, 18(1), 27-47. doi: 10.1038/cr.2008.8
- Hinz, J. M., Mao, P., McNeill, D. R., & Wilson, D. M., 3rd. (2015). Reduced Nuclease Activity of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (APE1) Variants on Nucleosomes: Identification of Access Residues. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M115.665547

- Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, *361*(15), 1475-1485. doi: 10.1056/NEJMra0804615
- Hosseini, M., Ezzedine, K., Taieb, A., & Rezvani, H. R. (2015). Oxidative and energy metabolism as potential clues for clinical heterogeneity in nucleotide excision repair disorders. *J Invest Dermatol*, *135*(2), 341-351. doi: 10.1038/jid.2014.365
- Ito, S., Kuraoka, I., Chymkowitch, P., Compe, E., Takedachi, A., Ishigami, C., . . . Tanaka, K. (2007). XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol Cell*, *26*(2), 231-243. doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.013
- Iyama, T., & Wilson, D. M., 3rd. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*, *12*(8), 620-636. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.015
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*(7267), 1071-1078. doi: 10.1038/nature08467
- Jeppesen, D. K., Bohr, V. A., & Stevnsner, T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, *94*(2), 166-200. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.04.013
- Jung, Y., & Lippard, S. J. (2007). Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev*, *107*(5), 1387-1407. doi: 10.1021/cr068207j
- Kakarougkas, A., & Jeggo, P. A. (2014). DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol*, *87*(1035), 20130685. doi: 10.1259/bjr.20130685

- Kamileri, I., Karakasilioti, I., & Garinis, G. A. (2012). Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet*, 28(11), 566-573. doi: 10.1016/j.tig.2012.06.004
- Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T., & Inagaki, M. (2010). 14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *Embo j*, 29(16), 2802-2812. doi: 10.1038/emboj.2010.157
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 7(8), 573-584. doi: 10.1038/nrc2167
- Kim, J. K., & Choi, B. S. (1995). The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'-->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement. *Eur J Biochem*, 228(3), 849-854.
- Kim, Y. J., & Wilson, D. M., 3rd. (2012). Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol*, 5(1), 3-13.
- King, B. S., Cooper, K. L., Liu, K. J., & Hudson, L. G. (2012). Poly(ADP-ribose) contributes to an association between poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xeroderma pigmentosum complementation group A in nucleotide excision repair. *J Biol Chem*, 287(47), 39824-39833. doi: 10.1074/jbc.M112.393504
- Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K., & Ohnishi, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids*, 2010, 543531. doi: 10.4061/2010/543531
- Kraemer, K. H., Patronas, N. J., Schiffmann, R., Brooks, B. P., Tamura, D., & DiGiovanna, J. J. (2007). Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and

- Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience*, 145(4), 1388-1396. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.12.020
- Lagerwerf, S., Vrouwe, M. G., Overmeer, R. M., Fousteri, M. I., & Mullenders, L. H. (2011). DNA damage response and transcription. *DNA Repair (Amst)*, 10(7), 743-750. doi: 10.1016/j.dnarep.2011.04.024
- Laine, J. P., & Egly, J. M. (2006). When transcription and repair meet: a complex system. *Trends Genet*, 22(8), 430-436. doi: 10.1016/j.tig.2006.06.006
- Lamarche, B. J., Orazio, N. I., & Weitzman, M. D. (2010). The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett*, 584(17), 3682-3695. doi: 10.1016/j.febslet.2010.07.029
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*, 58, 913-949. doi: 10.1146/annurev.bi.58.070189.004405
- Lau, N. C., Kolkman, A., van Schaik, F. M., Mulder, K. W., Pijnappel, W. W., Heck, A. J., & Timmers, H. T. (2009). Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits. *Biochem J*, 422(3), 443-453. doi: 10.1042/bj20090500
- Laugel, V. (2013). Cockayne syndrome: the expanding clinical and mutational spectrum. *Mech Ageing Dev*, 134(5-6), 161-170. doi: 10.1016/j.mad.2013.02.006
- Laugel, V., Dalloz, C., Durand, M., Sauvanaud, F., Kristensen, U., Vincent, M. C., . . . Dollfus, H. (2010). Mutation update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne syndrome. *Hum Mutat*, 31(2), 113-126. doi: 10.1002/humu.21154

- Laugsch, M., Seebach, J., Schnittler, H., & Jessberger, R. (2013). Imbalance of SMC1 and SMC3 cohesins causes specific and distinct effects. *PLoS One*, 8(6), e65149. doi: 10.1371/journal.pone.0065149
- Le May, N., Mota-Fernandes, D., Velez-Cruz, R., Iltis, I., Biard, D., & Egly, J. M. (2010). NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol Cell*, 38(1), 54-66. doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.004
- Lee, T. H., Park, J. M., Leem, S. H., & Kang, T. H. (2014). Coordinated regulation of XPA stability by ATR and HERC2 during nucleotide excision repair. *Oncogene*, 33(1), 19-25. doi: 10.1038/onc.2012.539
- Li, G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*, 18(1), 85-98. doi: 10.1038/cr.2007.115
- Li, Y., Chirgadze, D. Y., Bolanos-Garcia, V. M., Sibanda, B. L., Davies, O. R., Ahnesorg, P., . . . Blundell, T. L. (2008). Crystal structure of human XLF/Cernunnos reveals unexpected differences from XRCC4 with implications for NHEJ. *Embo j*, 27(1), 290-300. doi: 10.1038/sj.emboj.7601942
- Li, Z., Musich, P. R., Cartwright, B. M., Wang, H., & Zou, Y. (2013). UV-induced nuclear import of XPA is mediated by importin-alpha4 in an ATR-dependent manner. *PLoS One*, 8(7), e68297. doi: 10.1371/journal.pone.0068297
- Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 79, 181-211. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131

- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709-715. doi: 10.1038/362709a0
- Ljungman, M., & Lane, D. P. (2004). Transcription - guarding the genome by sensing DNA damage. *Nat Rev Cancer*, 4(9), 727-737. doi: 10.1038/nrc1435
- Malina, J., Scott, P., & Brabec, V. (2015). Shape-selective recognition of DNA abasic sites by metallohelices: inhibition of human AP endonuclease 1. *Nucleic Acids Res*, 43(11), 5297-5306. doi: 10.1093/nar/gkv438
- Marine, J. C., & Lozano, G. (2010). Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death Differ*, 17(1), 93-102. doi: 10.1038/cdd.2009.68
- Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W., & Hoeijmakers, J. H. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(7), 465-481. doi: 10.1038/nrm3822
- Matsuda, N., Azuma, K., Saijo, M., Iemura, S., Hioki, Y., Natsume, T., . . . Tanaka, K. (2005). DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquitylated by Cullin 4A-based ubiquitin ligase complex. *DNA Repair (Amst)*, 4(5), 537-545. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.12.012
- Mayne, L. V., & Lehmann, A. R. (1982). Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum. *Cancer Res*, 42(4), 1473-1478.
- Meek, K., Dang, V., & Lees-Miller, S. P. (2008). DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol*, 99, 33-58. doi: 10.1016/s0065-2776(08)00602-0

- Mehta, A., & Haber, J. E. (2014). Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(9), a016428. doi: 10.1101/cshperspect.a016428
- Mishina, Y., Duguid, E. M., & He, C. (2006). Direct reversal of DNA alkylation damage. *Chem Rev*, 106(2), 215-232. doi: 10.1021/cr0404702
- Missura, M., Buterin, T., Hindges, R., Hubscher, U., Kasparkova, J., Brabec, V., & Naegeli, H. (2001). Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair. *Embo j*, 20(13), 3554-3564. doi: 10.1093/emboj/20.13.3554
- Mitchell, D. (2006). Revisiting the photochemistry of solar UVA in human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(37), 13567-13568. doi: 10.1073/pnas.0605833103
- Moor, N. A., Vasil'eva, I. A., Anarbaev, R. O., Antson, A. A., & Lavrik, O. I. (2015). Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair. *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/nar/gkv569
- Moser, J., Kool, H., Giakzidis, I., Caldecott, K., Mullenders, L. H., & Foustero, M. I. (2007). Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell*, 27(2), 311-323. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.014
- Muniandy, P. A., Liu, J., Majumdar, A., Liu, S. T., & Seidman, M. M. (2010). DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 45(1), 23-49. doi: 10.3109/10409230903501819
- Nam, E. A., & Cortez, D. (2011). ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J*, 436(3), 527-536. doi: 10.1042/bj20102162

- Neal, J. A., & Meek, K. (2011). Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? *Mutat Res*, *711*(1-2), 73-86. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.02.010
- Nguyen, T. A., Slattery, S. D., Moon, S. H., Darlington, Y. F., Lu, X., & Donehower, L. A. (2010). The oncogenic phosphatase WIP1 negatively regulates nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*, *9*(7), 813-823. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.04.005
- Nicholson, B., & Suresh Kumar, K. G. (2011). The multifaceted roles of USP7: new therapeutic opportunities. *Cell Biochem Biophys*, *60*(1-2), 61-68. doi: 10.1007/s12013-011-9185-5
- Niedernhofer, L. J., Bohr, V. A., Sander, M., & Kraemer, K. H. (2011). Xeroderma pigmentosum and other diseases of human premature aging and DNA repair: molecules to patients. *Mech Ageing Dev*, *132*(6-7), 340-347. doi: 10.1016/j.mad.2011.06.004
- Nospikel, T. (2009). DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci*, *66*(6), 994-1009. doi: 10.1007/s00018-009-8737-y
- Ogi, T., Limsirichaikul, S., Overmeer, R. M., Volker, M., Takenaka, K., Cloney, R., . . . Lehmann, A. R. (2010). Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol Cell*, *37*(5), 714-727. doi: 10.1016/j.molcel.2010.02.009
- Olson, E., Nievera, C. J., Lee, A. Y., Chen, L., & Wu, X. (2007). The Mre11-Rad50-Nbs1 complex acts both upstream and downstream of ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related protein (ATR) to regulate the S-phase checkpoint

- following UV treatment. *J Biol Chem*, 282(31), 22939-22952. doi: 10.1074/jbc.M702162200
- Pan, Y. R., & Lee, E. Y. (2009). UV-dependent interaction between Cep164 and XPA mediates localization of Cep164 at sites of DNA damage and UV sensitivity. *Cell Cycle*, 8(4), 655-664.
- Patel, K. J., & Joenje, H. (2007). Fanconi anemia and DNA replication repair. *DNA Repair (Amst)*, 6(7), 885-890. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.02.002
- Pellegrini, L., Yu, D. S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T. L., & Venkitaraman, A. R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*, 420(6913), 287-293. doi: 10.1038/nature01230
- Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. (2010). Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids*, 2010. doi: 10.4061/2010/592980
- Ravanat, J. L., Douki, T., & Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*, 63(1-3), 88-102.
- Sale, J. E., Lehmann, A. R., & Woodgate, R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(3), 141-152. doi: 10.1038/nrm3289
- Schwertman, P., Vermeulen, W., & Marteijn, J. A. (2013). UVSSA and USP7, a new couple in transcription-coupled DNA repair. *Chromosoma*, 122(4), 275-284. doi: 10.1007/s00412-013-0420-2
- Scully, R., & Xie, A. (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res*, 750(1-2), 5-14. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.007

- Sedgwick, B., Bates, P. A., Paik, J., Jacobs, S. C., & Lindahl, T. (2007). Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst)*, 6(4), 429-442. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.10.005
- Sepe, S., Payan-Gomez, C., Milanese, C., Hoeijmakers, J. H., & Mastroberardino, P. G. (2013). Nucleotide excision repair in chronic neurodegenerative diseases. *DNA Repair (Amst)*, 12(8), 568-577. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.009
- Shabbir, S. H. (2015). DNA Repair Dysfunction and Neurodegeneration: Lessons From Rare Pediatric Disorders. *J Child Neurol*. doi: 10.1177/0883073815592221
- Shahar, O. D., Raghu Ram, E. V., Shimshoni, E., Hareli, S., Meshorer, E., & Goldberg, M. (2012). Live imaging of induced and controlled DNA double-strand break formation reveals extremely low repair by homologous recombination in human cells. *Oncogene*, 31(30), 3495-3504. doi: 10.1038/onc.2011.516
- Shell, S. M., & Zou, Y. (2008). Other proteins interacting with XP proteins. *Adv Exp Med Biol*, 637, 103-112.
- Shibata, A., & Jeggo, P. A. (2014). DNA double-strand break repair in a cellular context. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 26(5), 243-249. doi: 10.1016/j.clon.2014.02.004
- Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A. S., Perry, J., Harding, S. M., Genois, M. M., . . . Tainer, J. A. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol Cell*, 53(1), 7-18. doi: 10.1016/j.molcel.2013.11.003
- Shiotani, B., & Zou, L. (2009). ATR signaling at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 3), 301-304. doi: 10.1242/jcs.035105

- Singh, A., Compe, E., Le May, N., & Egly, J. M. (2015). TFIIH subunit alterations causing xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy specifically disturb several steps during transcription. *Am J Hum Genet*, *96*(2), 194-207. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.12.012
- Soufir, N., Ged, C., Bourillon, A., Austerlitz, F., Chemin, C., Stary, A., . . . Sarasin, A. (2010). A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from north Africa. *J Invest Dermatol*, *130*(6), 1537-1542. doi: 10.1038/jid.2009.409
- Staresincic, L., Fagbemi, A. F., Enzlin, J. H., Gourdin, A. M., Wijgers, N., Dunand-Sauthier, I., . . . Scharer, O. D. (2009). Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *Embo j*, *28*(8), 1111-1120. doi: 10.1038/emboj.2009.49
- Stefanini, M., Botta, E., Lanzafame, M., & Orioli, D. (2010). Trichothiodystrophy: from basic mechanisms to clinical implications. *DNA Repair (Amst)*, *9*(1), 2-10. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.10.005
- Stracker, T. H., & Petrini, J. H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *12*(2), 90-103. doi: 10.1038/nrm3047
- Stracker, T. H., Usui, T., & Petrini, J. H. (2009). Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, *8*(9), 1047-1054. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.04.012

- Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., . . . Hanaoka, F. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell*, *121*(3), 387-400. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.035
- Sullivan, K. D., Gallant-Behm, C. L., Henry, R. E., Fraikin, J. L., & Espinosa, J. M. (2012). The p53 circuit board. *Biochim Biophys Acta*, *1825*(2), 229-244. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.01.004
- Swenberg, J. A., Lu, K., Moeller, B. C., Gao, L., Upton, P. B., Nakamura, J., & Starr, T. B. (2011). Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. *Toxicol Sci*, *120 Suppl 1*, S130-145. doi: 10.1093/toxsci/kfq371
- Symington, L. S., & Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*, *45*, 247-271. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132435
- Tessman, I., Liu, S. K., & Kennedy, M. A. (1992). Mechanism of SOS mutagenesis of UV-irradiated DNA: mostly error-free processing of deaminated cytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(4), 1159-1163.
- Theil, A. F., Hoeijmakers, J. H., & Vermeulen, W. (2014). TTDA: big impact of a small protein. *Exp Cell Res*, *329*(1), 61-68. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.07.008
- Tsodikov, O. V., Ivanov, D., Orelli, B., Staresincic, L., Shoshani, I., Oberman, R., . . . Ellenberger, T. (2007). Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA. *Embo j*, *26*(22), 4768-4776. doi: 10.1038/sj.emboj.7601894

- Ummat, A., Rechkoblit, O., Jain, R., Roy Choudhury, J., Johnson, R. E., Silverstein, T. D., . . . Aggarwal, A. K. (2012). Structural basis for cisplatin DNA damage tolerance by human polymerase eta during cancer chemotherapy. *Nat Struct Mol Biol*, *19*(6), 628-632. doi: 10.1038/nsmb.2295
- van Cuijk, L., van Belle, G. J., Turkyilmaz, Y., Poulsen, S. L., Janssens, R. C., Theil, A. F., . . . Lans, H. (2015). SUMO and ubiquitin-dependent XPC exchange drives nucleotide excision repair. *6*, 7499. doi: 10.1038/ncomms8499
- van Cuijk, L., Vermeulen, W., & Marteijn, J. A. (2014). Ubiquitin at work: the ubiquitous regulation of the damage recognition step of NER. *Exp Cell Res*, *329*(1), 101-109. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.07.018
- Velez-Cruz, R., & Egly, J. M. (2013). Cockayne syndrome group B (CSB) protein: at the crossroads of transcriptional networks. *Mech Ageing Dev*, *134*(5-6), 234-242. doi: 10.1016/j.mad.2013.03.004
- Viprakasit, V., Gibbons, R. J., Broughton, B. C., Tolmie, J. L., Brown, D., Lunt, P., . . . Higgs, D. R. (2001). Mutations in the general transcription factor TFIIF result in beta-thalassaemia in individuals with trichothiodystrophy. *Hum Mol Genet*, *10*(24), 2797-2802.
- Wakasugi, M., Kasashima, H., Fukase, Y., Imura, M., Imai, R., Yamada, S., . . . Matsunaga, T. (2009). Physical and functional interaction between DDB and XPA in nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res*, *37*(2), 516-525. doi: 10.1093/nar/gkn964
- Wallace, S. S., Murphy, D. L., & Sweasy, J. B. (2012). Base excision repair and cancer. *Cancer Lett*, *327*(1-2), 73-89. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.038

- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, *171*(4356), 737-738.
- Weber, A. M., & Ryan, A. J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther*, *149*, 124-138. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.12.001
- Williams, R. S., Dodson, G. E., Limbo, O., Yamada, Y., Williams, J. S., Guenther, G., . . . Tainer, J. A. (2009). Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. *Cell*, *139*(1), 87-99. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.033
- Wu, X., Shell, S. M., Yang, Z., & Zou, Y. (2006). Phosphorylation of nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A by ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related-dependent checkpoint pathway promotes cell survival in response to UV irradiation. *Cancer Res*, *66*(6), 2997-3005. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-3403
- Xiao, X., Melton, D. W., & Gourley, C. (2014). Mismatch repair deficiency in ovarian cancer -- molecular characteristics and clinical implications. *Gynecol Oncol*, *132*(2), 506-512. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.12.003
- Yang, Z. G., Liu, Y., Mao, L. Y., Zhang, J. T., & Zou, Y. (2002). Dimerization of human XPA and formation of XPA2-RPA protein complex. *Biochemistry*, *41*(43), 13012-13020.
- Yuan, X., Feng, W., Imhof, A., Grummt, I., & Zhou, Y. (2007). Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol Cell*, *27*(4), 585-595. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.021

- Zhang, J., Dewar, J. M., Budzowska, M., Motnenko, A., Cohn, M. A., & Walter, J. C. (2015). DNA interstrand cross-link repair requires replication-fork convergence. *Nat Struct Mol Biol*, *22*(3), 242-247. doi: 10.1038/nsmb.2956
- Zhang, J., & Walter, J. C. (2014). Mechanism and regulation of incisions during DNA interstrand cross-link repair. *DNA Repair (Amst)*, *19*, 135-142. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.03.018
- Zhang, S., Chea, J., Meng, X., Zhou, Y., Lee, E. Y., & Lee, M. Y. (2008). PCNA is ubiquitinated by RNF8. *Cell Cycle*, *7*(21), 3399-3404.
- Zhong, H., Bryson, A., Eckersdorff, M., & Ferguson, D. O. (2005). Rad50 depletion impacts upon ATR-dependent DNA damage responses. *Hum Mol Genet*, *14*(18), 2685-2693. doi: 10.1093/hmg/ddi302
- Ziani, S., Nagy, Z., Alekseev, S., Soutoglou, E., Egly, J. M., & Coin, F. (2014). Sequential and ordered assembly of a large DNA repair complex on undamaged chromatin. *J Cell Biol*, *206*(5), 589-598. doi: 10.1083/jcb.201403096