

Université de Montréal

**EFFET DU SYSTÈME DE RÉPARATION DES APPARIEMENTS
ERRONÉS DE BASES ET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE SUR LA
RECOMBINAISON HOMOLOGUE.**

par

Josée-France Villemure

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

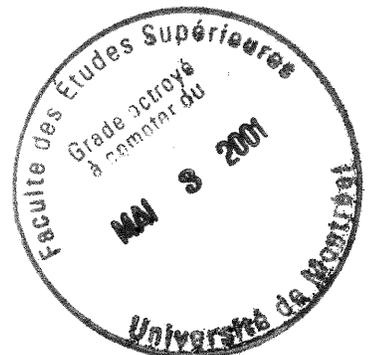
En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph. D.)

en biologie moléculaire

Décembre, 2000

© Josée-France Villemure, 2000



QH

506

US4

2001

v. 004

2001 8 144

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée;

**EFFET DU SYSTÈME DE RÉPARATION DES APPARIEMENTS ERRONÉS DE
BASES ET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE SUR LA RECOMBINAISON
HOMOLOGUE.**

présentée par

Josée-France Villemure

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury	Dr Edward Bradley
Directeur de recherche	Dr Abdellah Belmaaza
Membre du jury	Dr Eric Milot
Examineur externe	Dr Régen Drouin

Thèse acceptée le:.....

SOMMAIRE

Des études faites chez les bactéries, les levures et les mammifères ont démontré que la recombinaison homologue, mécanisme impliqué dans la ségrégation ordonnée des chromosomes et la réparation de l'ADN, est plus fréquente entre les séquences d'ADN identiques qu'entre des séquences d'ADN divergentes. Chez les bactéries et les levures, cette diminution de la fréquence de recombinaison entre les séquences divergentes est attribuable au système de réparation des appariements erronés de bases qui assure principalement la fidélité de la réplication. Le niveau élevé de conservation de ce système de réparation suggère que le système des mammifères pourrait aussi avoir un effet inhibiteur sur la recombinaison homologue entre des séquences divergentes. Ainsi la divergence existant entre les séquences répétitives intercalaires pourrait permettre au système de réparation des appariements erronés de bases d'inhiber la recombinaison homologue entre elles de façon à prévenir les réarrangements chromosomiques et à assurer la stabilité du génome.

Les essais de recombinaison couramment utilisés chez les mammifères ne permettent pas d'étudier l'effet du système de réparation des appariements erronés de bases sur la recombinaison entre des séquences divergentes. Afin de déterminer cet effet, nous avons développé un essai de recombinaison qui fait intervenir des séquences d'ADN identiques ou 85% homologues situées dans l'intron artificiel du marqueur de sélection néomycine dont l'exon 3' est en orientation inverse par rapport à l'exon 5'. La recombinaison entre des séquences d'ADN situées de part et d'autre de l'exon 3' du gène néomycine entraînera une modification de l'orientation relative des deux exons de façon à reconstituer un gène néomycine fonctionnel. Le marqueur de sélection fonctionnel sera utilisé pour isoler les cellules dans lesquelles des événements de recombinaison ont pris place.

L'essai a été effectué dans des cellules de mammifères dont le système de réparation des appariements erronés de bases est fonctionnel ou déficient. Les séquences divergentes ont une efficacité de recombinaison spontanée plus faible que les séquences identiques et cette diminution est moins prononcée en absence qu'en présence de réparation des appariements erronés de bases. Ces résultats indiquent que le système de réparation des appariements erronés de bases diminue la fréquence de recombinaison spontanée entre des séquences divergentes. L'analyse des recombinants nous indique que cette diminution serait due à l'inhibition de l'initiation de la recombinaison spontanée.

En présence de cassures bicaténares d'ADN, nos résultats montrent que les séquences identiques et divergentes se recombinent à la même fréquence indépendamment du statut du système de réparation. L'analyse des recombinants obtenus suite à la réparation de cassures bicaténares d'ADN nous indique que des proportions similaires de recombinants précis et imprécis sont observées avec les séquences identiques alors qu'en présence de divergence, aucun recombinant précis n'est formé dans les cellules qui font la réparation des appariements erronés de bases. Cependant, les séquences identiques et les séquences divergentes ne génèrent que des recombinants imprécis dans les cellules où le système de réparation des appariements erronés de bases est non-fonctionnel suggérant que ce système est nécessaire à la formation des recombinants de type précis.

Ces résultats indiquent que le système de réparation des appariements erronés de bases des mammifères exercerait un effet inhibiteur sur la recombinaison homologue spontanée entre des séquences divergentes, possiblement dans le but d'assurer la stabilité du génome de la cellule en prévenant les réarrangements chromosomiques. Cependant, en présence de cassures bicaténares d'ADN, le système de réparation des appariements erronés de bases ne diminuerait pas la fréquence de recombinaison entre des séquences divergentes afin de permettre à la cellule de réparer efficacement la lésion, mais contribuerait à une réparation précise de la lésion afin de sauvegarder la stabilité du génome.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
REMERCIEMENTS	xv
<u>CHAPITRE I: INTRODUCTION</u>	1
1.1 LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE	2
1.1.1 LES RÔLES DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE	4
1.1.1.1 La recombinaison méiotique	5
1.1.1.2 La recombinaison mitotique	6
1.1.2 LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE CONSERVATRICE	7
1.1.2.1 Les modèles de recombinaison homologue conservatrice	7
1.1.2.1.1 Le modèle de Holliday (1964)	9
1.1.2.1.2 Le modèle de Meselson et Radding (1975)	11
1.1.2.1.3 Le modèle de Szostak et al. (1983)	15

1.1.2.1.4 Le modèle de « <i>one-sided invasion</i> » (1994)	19
1.1.3 LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE NON-CONSERVATRICE	24
1.1.3.1 Le modèle de « <i>single-strand annealing</i> »	24
1.1.4 LA RECOMBINAISON ILLÉGITIME	26
1.1.5 LES ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LA RECOMBINAISON MITOTIQUE	28
1.1.5.1 Les enzymes de recombinaison homologue conservatrice	28
1.1.5.2 Les enzymes de recombinaison homologue non-conservatrice	32
1.1.5.3 Les enzymes de recombinaison illégitime	33
1.2 STABILITÉ GÉNOMIQUE	34
1.2.1 CONTRÔLE DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE PAR L'HOMOLOGIE DE SÉQUENCE	36
1.2.2 LE SYSTÈME DE RÉPARATION DES APPARIEMENTS ERRONÉS DE BASES	38
1.2.2.1 Le système de MMR chez <i>E. coli</i>	39
1.2.2.2 Le système de réparation des eucaryotes	42
1.2.2.2.1 La reconnaissance des appariements erronés de bases par les homologues de MutS	43
1.2.2.2.2 Rôle des homologues de MutL dans le MMR ..	45

1.2.2.2.3 La discrimination des brins	46
1.2.2.2.4 L'excision et la resynthèse d'ADN	47
1.2.2.2.5 L'implication des protéines de MMR dans la recombinaison méiotique	49
1.2.2.3 Contrôle de la recombinaison homologue par le système de MMR	50
1.2.3 CONTRÔLE DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE PAR P53	52
1.2.4 RÔLES PARADOXALES DE P53 ET DU SYSTÈME DE MMR DANS LE MAINTIEN DE LA STABILITÉ GÉNOMIQUE	53
1.3 OBJECTIFS	54
<u>CHAPITRE II: MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	56
2.1 CONSTRUCTION DE VECTEURS	57
2.1.1 CONSTRUCTION DE PJF2	58
2.1.2 CONSTRUCTION DE PBV100	59
2.1.3 CONSTRUCTION DE PL1DIR100	60
2.1.4 CONSTRUCTION DE PST100 ET PST85	60
2.2 CULTURE DE CELLULES	62
2.3 TRANSFECTION DE CELLULES	63

2.3.1 ELECTROPORATION	63
2.3.2 AGENTS DE SÉLECTION	64
2.4 EXTRACTION D'ADN GÉNOMIQUE	66
2.5 ÉTABLISSEMENT DE CLONES CELLULAIRES PARENTAUX	66
2.6 ANALYSE DES RECOMBINANTS OBTENUS AVEC LES PLASMIDES PST100 ET PST85	67
2.7 EXTRACTION DE PROTÉINES	68
2.8 TECHNIQUE DE TRANSFERT DE WESTERN	69
2.9 ANALYSE FONCTIONNELLE DU SYSTÈME DE RÉPARATION DES BASES MAL APPARIÉES	69
2.9.1 RÉSISTANCE À UN AGENT ALKYLANT	69
2.9.2 TAUX DE MUTATION DU GÈNE HPRT	70
<u>CHAPITRE III: RÉSULTATS</u>	71
3.1 MISE AU POINT D'UN ESSAI DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE NON-SÉLECTIF	72
3.1.1 ESSAI DE RECOMBINAISON BASÉ SUR L'ACQUISITION D'UNE SÉQUENCE PROMOTRICE	74
3.1.2 ESSAI DE RECOMBINAISON BASÉ SUR LA PERTE D'UNE SÉQUENCE PROMOTRICE	95
3.1.3 ESSAI DE RECOMBINAISON BASÉ SUR L'EXCISION DES MARQUEURS DE SÉLECTION	100
3.1.4 ESSAI DE RECOMBINAISON BASÉ SUR LA RECONSTITUTION D'UN INTRON DANS UN MARQUEUR DE SÉLECTION	104

3.2 ÉTUDE DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE EXTRACHROMOSOMIQUE	111
3.2.1 RECOMBINAISON HOMOLOGUE SPONTANÉE	111
3.2.2 EFFET DU SYSTÈME DE MMR SUR LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE	115
3.2.3 ANALYSE DES RECOMBINANTS PAR LA TECHNIQUE DE PCR	119
3.2.4 COMPLÉMENTATION DES CELLULES HCT116 ET SKUT-1	123
3.2.5 RÉPARATION DES CASSURES BICATÉNAIRES D'ADN PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE	133
3.2.6 EFFET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE SUR LA STRUCTURE DES RECOMBINANTS INDUITS PAR CASSURES BICATÉNAIRES D'ADN.....	136
3.2.7 EFFET DU SYSTÈME DE MMR SUR LA STRUCTURE DES RECOMBINANTS INDUITS PAR RÉPARATION DES CASSURES BICATÉNAIRES D'ADN	141
 <u>CHAPITRE IV: DISCUSSION</u>	 146
 4.1 EFFET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE SUR LA RECOMBINAISON EXTRACHROMOSOMIQUE SPONTANÉE	 148
4.2 EFFET DU SYSTÈME DE MMR SUR LA RECOMBINAISON EXTRACHROMOSOMIQUE SPONTANÉE ENTRE DES SÉQUENCES 85% HOMOLOGUES	 152
4.3 EFFET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE SUR LE PROCESSUS DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE SPONTANÉE	 154
4.4 RÔLE DE MSH2 DANS L'INHIBITION DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE SPONTANÉE ENTRE LES SÉQUENCES DIVERGENTES	 155
4.5 EFFET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCES SUR LA RÉPARATION DES CASSURES BICATÉNAIRES D'ADN PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE	 157

4.6 MÉCANISME DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE LORS DE LA RÉPARATION DES CASSURES BICATÉNAIRES D'ADN	158
4.7 EFFET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE SUR LA STRUCTURE DES ÉVÉNEMENTS DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE INDUITS PAR CASSURES BICATÉNAIRES D'ADN	162
4.8 LES ÉTAPES DE RECOMBINAISON HOMOLOGUES AFFECTÉES PAR LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE ET LE SYSTÈME DE MMR	166
<u>CHAPITRE V: CONCLUSIONS</u>	168
RÉFÉRENCES	172
ANNEXE I:	xviii
<i>Effect of sequence divergence on the efficiency of extrachromosomal recombination in mismatch repair proficient and deficient mammalian cell lines</i>	
ANNEXE II:	xlix
<i>Chromatin insulators and matrix/scaffold attachment regions can protect a transgene from the negative effect of an adjacent promoter</i>	

LISTE DES FIGURES**CHAPITRE I**

Figure 1:	Recombinaison homologue	3
Figure 2:	Modèle de Holliday	10
Figure 3:	Modèle de Meselson et Radding	12
Figure 4:	Modèle de Szostak et al.	16
Figure 5:	Modèle de « one-sided invasion »	20
Figure 6:	Modèle de « single strand annealing »	25
Figure 7:	Réarrangements chromosomiques	35
Figure 8:	Mécanisme de réparation des appariements erronés de bases de <i>E. coli</i>	40
Figure 9:	Le système de MMR chez les eucaryotes	44

CHAPITRE III

Figure 10:	pJF2	75
Figure 11:	Colonies pJF2 résistantes à la sélection G418	76
Figure 12:	pJF2/Flip	78
Figure 13:	Expression relative de HSV-tk	81
Figure 14:	Intégrité de pJF2	83
Figure 15:	Nombre d'intégrations de pJF2	86
Figure 16:	Analyse des colonies pJF2 résistantes à la sélection G418	88

Figure 17:	Intégrité de pJF2 dans les colonies résistantes à la sélection G418	91
Figure 18:	Localisation du promoteur dans les colonies pJF2 résistantes à la sélection G418	93
Figure 19:	pBV100	96
Figure 20:	Recombinants pBV100	98
Figure 21:	pL1dir100 et recombinant	101
Figure 22:	pL1dirP100	103
Figure 23:	pST100 et pST85	106
Figure 24:	Recombinants pST100	107
Figure 25:	Efficacité d'épissage de l'intron artificiel dans le gène néomycine	109
Figure 26:	Expression des protéines Msh2 et Mlh1 dans les cellules SKUT-1 et HCT116	116
Figure 27:	Analyse des recombinants pST100 et pST85 par PCR	121
Figure 28:	PCR sur les recombinants pST100 et pST85	122
Figure 29:	pC4MLHwt	124
Figure 30:	Complémentation des cellules HCT116 avec pC4MLHwt ...	125
Figure 31:	Expression de Mlh1 avec une concentration élevée d'hygromycine	127
Figure 32:	Sensibilité au MNNG des cellules HCT116 complémenteés avec pC4MLHwt	129
Figure 33:	Fréquence de mutation du gène HPRT des cellules HCT116 complémentatées avec pC4MLHwt	130
Figure 34:	pC9MLHpuro et pC9MSHpuro	132

CHAPITRE IV

Figure 35:	Modèle de réparation des cassures d'ADN double-brin par recombinaison homologue	159
------------	---	-----

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre II

Tableau I:	Conditions de sélection pour chaque lignée cellulaire	65
------------	---	----

Chapitre III

Tableau II:	Interférence transcriptionnelle entre les gènes HSV- <i>tk</i> et néomycine du plasmide pJF2 dans les cellules LMTK	79
Tableau III:	Effet de la divergence entre les séquences et du système de MMR sur la recombinaison homologue spontanée extrachromosomique	113
Tableau IV:	Effet de la divergence entre les séquences et du système de MMR sur la réparation des cassures bicaténaire d'ADN au niveau extrachromosomique	134
Tableau V:	Effet de la divergence entre les séquences et du système de MMR sur la structure des recombinants suite à la réparation des cassures bicaténaires d'ADN	139

LISTE DES ABRÉVIATIONS

6-TG	6-Thioguanine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ARN	Acide ribonucléique
AS	<i>Acceptor site</i> , site accepteur d'épissage
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotide tri-phosphate
DS	<i>Donor site</i> , site donneur d'épissage
DSB	<i>Double-strand break</i> , cassure bicaténaire d'ADN
EDTA	<i>(Ethylenedinitrilo) tetraacetic acid</i>
EMCV	<i>Encephalomyocarditis virus</i> , virus de l'encéphalomyocardite
FIAU	1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodouridine
G418	Généticine
GAF	Ganciclovir, Aciclovir, FIAU
HAT	Hypoxanthine, aminoptérine, thymidine
HNPCC	<i>Hereditary non-polyposis colorectal cancer</i> , cancer colorectal non-polype
HPRT	Hypoxanthine phosphorybosyl transférase
HSV-tk	Thymidine kinase du virus Herpes simplex
kDa	kilo dalton
kpb	kilo paire de bases
L1Md	LINE-1 de souris <i>Musculus domesticus</i>
L1Rn	LINE-1 de rat <i>Ratus Norvegicus</i>
LINE	<i>Long interspersed nuclear element</i> , Longues séquences intercalaires nucléaires
MEPS	<i>Minimal efficient processing segment</i> (pb), longueur d'homologie minimale requise pour une recombinaison efficace
MLH	<i>MutL homologue</i> , homologue de MutL
MMR	<i>Mismatch repair</i> , réparation des appariements erronés de bases

MNNG	1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidine
MSH	<i>MutS</i> homologue, homologue de MutS
MSI	<i>microsatellite instability</i> , instabilité des microsatellites
NBS	<i>Nijmegen breakage syndrome</i> , syndrome de Nijmegen
Néo	Néomycine
NER	<i>Nucleotide excision repair</i> , réparation par excision de nucléotide
NHEJ	<i>Non homologous end joining</i> , union d'extrémités non-homologues
pb	paire de bases
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> ,
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> , antigène nucléaire de prolifération cellulaire
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , réaction de polymérase en chaîne
PMS	<i>Postmeiotic segregation</i> , ségrégation postméiotique
Pol2S	Promoteur court de l'ARN polymérase II de souris
Polio	Virus de la Poliomyélite
Pr	Promoteur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SINE	<i>Short interspersed nuclear element</i> , Séquences intercalaires nucléaires courtes
SSA	<i>Single-strand annealing</i> , appariement d'ADN monocaténaire
TE	Tris-EDTA
TFT	Trifluorothymidine

REMERCIEMENTS

Par la présente j'aimerais exprimer ma reconnaissance au docteur Abdellah Belmaaza pour son support tout au long de mes travaux. Je tiens à le remercier pour la formation qu'il m'a permis d'acquérir et le support financier qu'il m'a accordé.

Je remercie Shona Teijeiro avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler et qui m'a apporté une aide considérable.

Un grand merci à Sylvie et Louise pour leur énorme travail de lecture et de correction. J'apprécie grandement votre aide et votre générosité.

Je tiens aussi à exprimer ma très, très grande gratitude à toute ma famille qui a été très présente tout au long de mes études. Mon père qui a toujours le mot ou la citation appropriée pour m'encourager tout en me faisant rire, ainsi que ma mère et ma sœur qui m'ont beaucoup écoutée, encouragée et soutenue. Pierre, Hélène et Sylvie, ce travail, je vous le dédie. Je ne trouverai probablement jamais les mots pour vous exprimer à quel point votre présence et vos paroles d'encouragement m'ont aidée ni pour vous démontrer l'importance qu'elles ont toujours eues à mes yeux mais du fond du cœur, je vous dis un énorme MERCI.

Merci aussi à Benoît pour sa présence, ses conseils toujours judicieux et ses encouragements très, très appréciés.

Ce travail je tiens aussi à le dédier à mes filles, Stéphanie et Frédérique que j'adore plus que tout et qui sont deux anges vraiment merveilleux. Sans elles, tout ces efforts n'aurait pas la même signification. Stéphanie et Frédérique, je vous dois aussi un énorme MERCI.

*À mes filles Stéphanie et Frédérique,
Deux petits trésors qui me sont très chers,
Et que j'admire énormément,*

*À mon père, ma mère et ma sœur,
Pour leur confiance et leur support,*

« Science sans conscience n'est que ruine de l'âme »

Montaigne

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE

Le terme recombinaison homologue fait référence à une interaction physique qui survient entre deux séquences d'ADN identiques ou très similaires. Le processus de recombinaison homologue comporte plusieurs étapes où la similarité de séquence entre deux molécules d'ADN est recherchée, l'homologie est reconnue et les brins d'ADN sont mutuellement échangés entre les deux molécules d'ADN. De cette interaction, il résulte une ou deux molécules recombinantes qui dérivent des deux molécules d'ADN de départ sur le plan physique et parfois même sur le plan informationnel. Ainsi, une molécule recombinante peut être constituée de séquences d'ADN provenant des deux molécules parentales sans que son rôle fonctionnel ne soit modifié, ou bien elle peut être une combinaison sur le plan physique de même que sur le plan fonctionnel des deux molécules parentales. En conséquence, les interactions entre des séquences identiques comme par exemple les chromatides sœurs, sont considérées comme des événements de recombinaison même si le génotype de la cellule demeure inchangé.

La recombinaison homologue peut générer deux types de produits distincts, soit des événements d'enjambement ou des événements de conversion génique aussi appelés non-enjambement (Figure 1). L'enjambement correspond à un échange

Recombinaison homologue

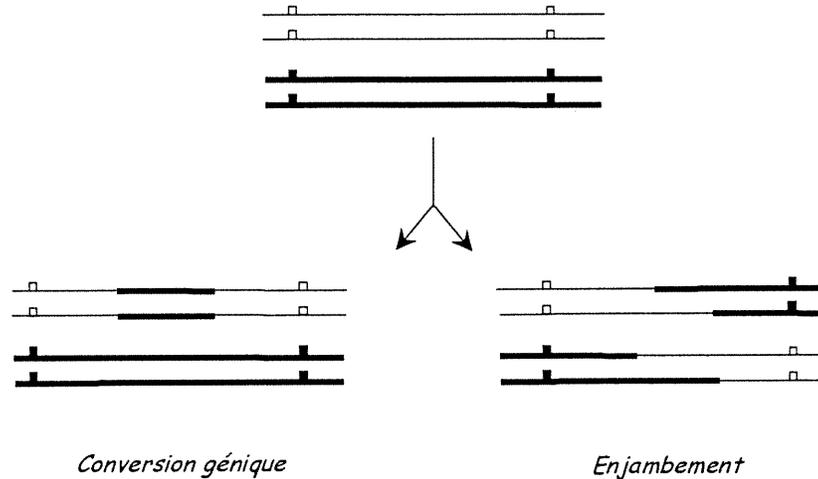


Figure 1:

La recombinaison homologue peut générer deux types de produits distincts: les événements de conversion génique qui consistent en un échange d'information génétique non-réciproque où l'une des molécules de départ, la molécule donneuse, demeure inchangée et les événements d'enjambement qui sont des échanges d'information génétique réciproques qui entraînent une modification de la liaison génétique entre les marqueurs (illustrés par des carrés noirs ou blancs) situés de part et d'autre du point d'échange

d'information génétique réciproque entre les deux partenaires impliqués et les molécules qui en résultent correspondent à la coupure dans les deux molécules de départ, à des sites homologues, suivie de leur réassociation de sorte qu'une partie de chaque molécule de départ s'associe avec une partie de l'autre molécule. Par conséquent, chacune des molécules d'ADN donne et reçoit de l'information génétique et la liaison génétique qui existait entre les marqueurs flanquant les sites de recombinaison se trouve modifiée. Dans le cas de la conversion génique, l'échange d'information génétique est non-réciproque de sorte qu'une des molécules d'ADN reçoit de l'information génétique d'une autre molécule d'ADN qui demeure inchangée. Dans ce cas, la liaison génétique existant entre les marqueurs qui flanquent le site de recombinaison n'est pas modifiée.

1.1.1 LES RÔLES DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE

Dans les cellules eucaryotes, la recombinaison a une importance fondamentale pour un très grand nombre de processus biologiques incluant la méiose, la stabilité des chromosomes, la variation antigénique et la diversité des gènes des immunoglobulines de même que le maintien du nombre de copies et de l'homogénéité de séquence dans les familles multigéniques. La recombinaison est aussi impliquée dans la transformation néoplasique (Labuda et al., 1995). De plus, chez plusieurs organismes, la modification spécifique des gènes (« *gene targeting* ») se fait de façon prédéterminée par recombinaison homologue entre les séquences chromosomiques et des séquences nouvellement introduites.

1.1.1.1 La recombinaison méiotique

Au niveau de la méiose, la recombinaison homologue assure la ségrégation ordonnée des chromosomes homologues via la formation des chiasmas (intermédiaires de recombinaison qui sont la représentation cytologique des enjambements). La résolution des chiasmas provoque la séparation des chromosomes homologues qui sont alignés à la plaque équatoriale, ce qui entraîne la modification de la répartition des gènes parentaux sur les chromosomes et ainsi un réassortiment des allèles qui se traduit par la diversité génétique (Hawley, 1988; Simchen et Hugerat, 1993). Les événements de conversion génique seraient pour leur part impliqués dans la diversification des gènes et expliqueraient en plus l'évolution concertée des familles multigéniques dont les membres sont plus homologues entre eux au sein d'une même espèce qu'entre différentes espèces (Liao et al., 1997; Wang et al., 1999; Wendel, 2000).

Lorsque la recombinaison méiotique est défectueuse, il y a non-disjonction des chromosomes homologues au cours de la première ou de la deuxième division cellulaire, ce qui peut causer l'aneuploïdie (nombre inapproprié de chromosomes) chez les gamètes qui peuvent alors contribuer à la production d'embryons non-viables ou anormaux (Carpenter, 1994; Hawley, 1988; Orr-Weaver, 1999; Roeder, 1990)

1.1.1.2 La recombinaison mitotique

Au niveau de la mitose, la recombinaison homologue est une des voies majeures de réparation des cassures bicaténares d'ADN (Liang et al. 1998). Chez les mammifères, il survient en moyenne huit à dix cassures bicaténares d'ADN par cellule, par jour (Breinstein et Breinstein, 1991). Ces cassures sont induites suite au métabolisme normal des cellules comme l'effondrement des fourches de réplication (Kenneth, 2000) ou la réparation de dommages causés à l'ADN (ex. systèmes de réparation des appariements erronés de bases et de réparation par excision de nucléotides). Des dommages peuvent aussi être causés par des agents endogènes comme les radicaux libres produits par le métabolisme oxydatif ou des agents exogènes tel que des composés chimiques génotoxiques et des radiations ionisantes incluant les rayons ultraviolets et les rayons X provenant de l'environnement ou utilisés en médecine pour le diagnostic et la thérapie anti-cancéreuse (Friedberg et al., 1995; Ward, 1988; Ward, 1995). Les cassures bicaténares d'ADN sont aussi impliquées dans plusieurs processus cellulaires normaux chez les eucaryotes tels que la commutation de « *mating-type* » chez *Saccharomyces cerevisiae* (Haber, 1992) et *Schizosaccharomyces pombe* (Klar, 1992), la transposition des éléments P chez *Drosophila melanogaster* (Lankenau, 1995) et le réarrangement site-spécifique des gènes V(D)J (*Variable [diversity] Joining*) qui contribue à la diversité des immunoglobulines et des récepteurs des cellules T, chez les vertébrés (Lewis, 1994).

Si une cassure bicaténaire d'ADN n'est pas réparée, sa réplication peut provoquer un bris de chromosome et entraîner la mort cellulaire par apoptose (Bennett, 1993), alors qu'une cassure bicaténaire d'ADN qui serait mal réparée, pourrait provoquer des réarrangements génomiques et, dans certains cas, le cancer (Bryant et Riches, 1989; Columna et al., 1993; Friedberg et al., 1995; Gonzalez et al., 1999; Jeffs et al., 1998; Labuda et al., 1995; Lasko et al., 1991; Matsuda et al., 1999; Schoenmakers et al., 1999; Ward, 1988; Ward, 1995). La réparation des cassures bicaténaires d'ADN est donc nécessaire à la survie de la cellule et au maintien de la stabilité de son génome.

1.1.2 LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE CONSERVATRICE

La recombinaison homologue décrite dans les paragraphes précédents est dite conservatrice parce que toutes les séquences d'ADN impliquées dans le processus sont conservées et se retrouvent dans les produits de recombinaison (voir figure 1).

1.1.2.1 Modèles de recombinaison homologue conservatrice

Les étapes précises par lesquelles la recombinaison homologue spontanée se produit dans les cellules ne sont pas encore très bien connues. Toutefois, plusieurs modèles ont été proposés pour tenter d'expliquer les produits de recombinaison homologue observés chez divers organismes. Tous les modèles de recombinaison

impliquent la formation d'un intermédiaire d'ADN bicaténaire dont un brin provient de chaque molécule d'ADN parental. Cette étape de formation de l'intermédiaire d'ADN bicaténaire est appelée l'échange de brins et elle est précédée d'une étape de synapse qui permet dans un premier temps d'aligner les deux molécules d'ADN bicaténaire homologues. Les modèles de recombinaison proposés font tous intervenir des jonctions de types plectonémiques où les bases entre les deux molécules d'ADN parental s'apparient. Cependant, ces modèles n'excluent pas la possibilité que la synapse soit initiée, à une étape antérieure, par un intermédiaire protéique. Celui-ci permettrait une interaction entre les deux molécules parentales d'ADN, par une jonction de type paranémique où les brins de chaque molécule d'ADN bicaténaire se dérouleraient localement sur une certaine longueur avant de se réappairer avec les brins d'ADN de l'autre molécule parentale (Radding, 1988; Kleckner, 1996; Weiner et Kleckner, 1994).

La levure a d'abord été utilisée comme organisme modèle pour étudier la recombinaison homologue, principalement parce qu'elle permet de récupérer tous les produits des événements de recombinaison et de déterminer la constitution génétique de marqueurs prédéterminés pour chaque brin d'ADN de chaque chromatide présente après la méiose. Les premières analyses de recombinants ont révélé qu'environ 50% des cas de recombinaison par enjambement sont associés à des événements de conversion génique et que la fréquence des événements d'enjambement n'est pas répartie uniformément le long du chromosome. A la lumière de ces résultats, le Dr Robin Holliday a proposé un modèle de

recombinaison pour expliquer la relation entre les enjambements et la conversion génique.

1.1.2.1.1 Le modèle de Holliday (1964)

Ce modèle propose que l'induction de la recombinaison homologue spontanée se fait par des coupures d'ADN monocaténaire symétriques, une dans chaque molécule d'ADN bicaténaire qui participe à l'événement (Figure 2a). Ensuite les extrémités 5' générées par les coupures monocaténaire d'ADN sont échangées entre les molécules parentales, ce qui crée deux intermédiaires symétriques d'ADN bicaténaire (dont un brin d'ADN provient de chaque molécule parentale) et une jonction de Holliday (Figure 2b). Les extrémités sont liées pour terminer la formation de la jonction qui peut ensuite migrer dans les deux directions (Figure 2c et 2d). La jonction peut être résolue en conformation non-enjambement (Figure 2e) ou enjambement (Figure 2f). La correction d'un marqueur hétérozygote par le système de réparation des appariements erronés de bases (voir section 1.2.2) entraîne soit la conversion ou la restauration du marqueur selon le brin de l'ADN bicaténaire qui est choisi pour servir de matrice lors de la correction. Mais lorsqu'un marqueur hétérozygote n'est pas corrigé, la réplication des deux brins de la molécule d'ADN bicaténaire permet de former deux molécules d'ADN bicaténaire ne contenant pas d'appariement erroné de bases et qui se retrouve dans des cellules filles différentes, on dit alors qu'il y a eu une ségrégation postméiotique (PMS: *postmeiotic segregation*) de ce marqueur.

Modèle de Holliday

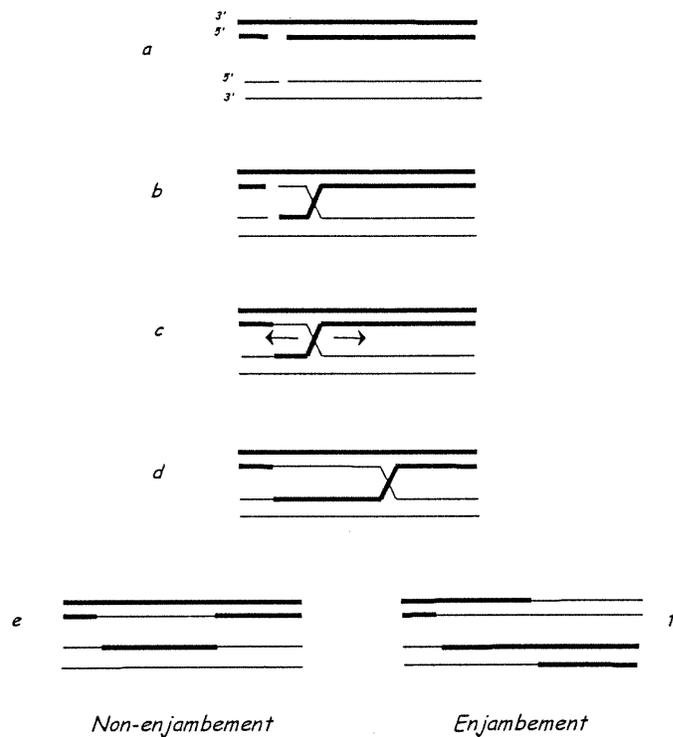


Figure 2:

Le Dr Robin Holliday a proposé un modèle de recombinaison symétrique initié par deux cassures monocaténares d'ADN, situées à des positions équivalentes dans les deux molécules d'ADN bicaténaire participantes (a). Les extrémités 5' sont échangées entre les molécules d'ADN bicaténaire (b) puis sont unies aux extrémités 3' de l'autre molécules d'ADN pour former une jonction de Holliday (c) qui peut migrer dans les deux directions (d) et dont la résolution peut résulter en événements de type non-enjambement (e) ou enjambement (g). La réparation des appariements erronés de bases présents dans l'intermédiaire d'ADN bicaténaire (e et f) permet de restaurer ou de convertir les marqueurs génétiques.

Après la proposition du modèle de recombinaison symétrique par le Dr Robin Holliday, de nouvelles études faites chez *Ascobolus immersus* et chez la levure ont démontré que les intermédiaires d'ADN bicaténaire sont rarement symétriques, c'est-à-dire que les produits de recombinaison prédits par le modèle de Holliday sont rarement détectés. Alors, pour tenir compte des produits de recombinaison issus des intermédiaires d'ADN asymétriques qui sont inexistantes dans le modèle de Holliday, les Drs Matthew S. Meselson et Charles M. Radding (1975) ont proposé un nouveau modèle de recombinaison homologue.

1.1.2.1.2 Le modèle de Meselson et Radding (1975)

Selon le modèle proposé par les Drs Matthew S. Meselson et Charles M. Radding (1975), l'initiation de la recombinaison homologue se fait par une coupure monocaténaire dans un seul ADN bicaténaire parental (Figure 3a). Ensuite l'extrémité 3' générée par la coupure monocaténaire amorce la synthèse d'ADN et amène le déplacement de l'extrémité 5' (Figure 3b). Cette extrémité est alors libre d'envahir la molécule parentale homologue et de former un intermédiaire d'ADN bicaténaire asymétrique tout en déplaçant une boucle d'ADN monocaténaire (D-loop) (Figure 3c). La boucle est par la suite dégradée par des nucléases (Figure 3d) et les extrémités qui en résultent sont liées au brin envahisseur sur le même ADN bicaténaire, et au brin nouvellement synthétisé sur l'autre ADN bicaténaire, pour former une jonction de Holliday (Figure 3e). La migration de cette jonction entraîne aussi la formation d'intermédiaires symétriques d'ADN bicaténaire et la résolution

Modèle de Meselson et Radding

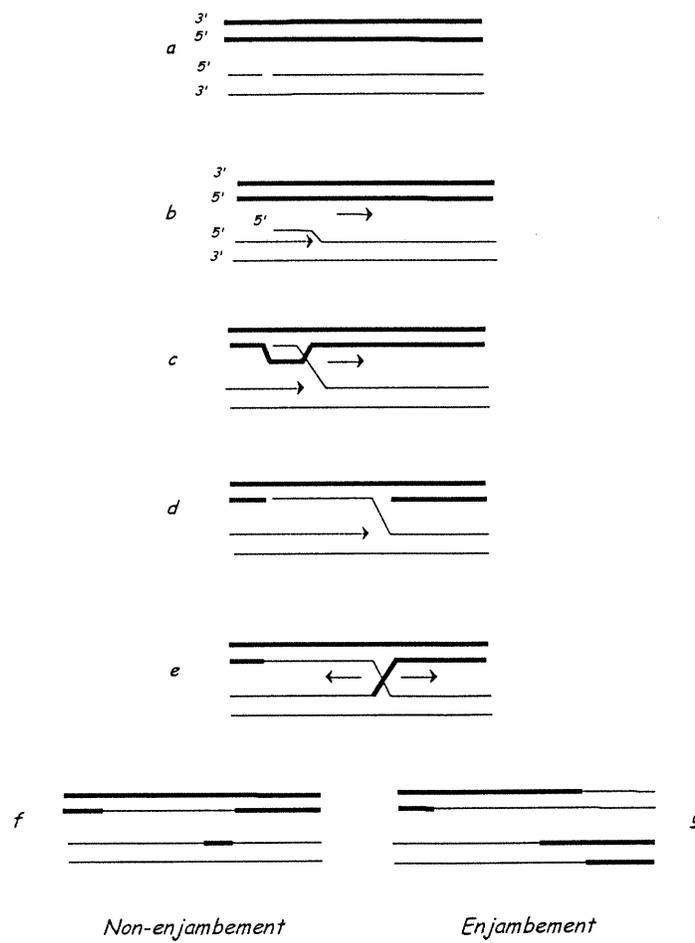


Figure 3: (Légende page suivante)

Figure 3 : Modèle de Meselson et Radding

Modèle de recombinaison initié par une cassure monocaténaire d'ADN dans une seule molécule parentale d'ADN (a). L'extrémité 3' de la coupure monocaténaire amorce la synthèse d'ADN et déplace l'extrémité 5' de la coupure (b) qui envahit la molécule d'ADN bicaténaire homologue receveuse en déplaçant une boucle d'ADN monocaténaire (c). La dégradation de la boucle monocaténaire (d) et l'union des extrémités permet la formation d'une jonction de Holliday (e). La résolution de la jonction de Holliday peut se faire par non-enjambement (f) ou par enjambement (g). La correction de l'intermédiaire d'ADN bicaténaire (f et g) permet de restaurer ou de convertir les marqueurs génétiques.

de la jonction peut générer des configurations de type non-enjambement (Figure 3f) ou enjambement (Figure 3g). Dans les configurations non-enjambement, le modèle prédit que la molécule receveuse correspond à l'ADN bicaténaire parental qui demeure non-coupé lors de l'étape d'initiation. Ce modèle de recombinaison permet d'expliquer les résultats obtenus chez *Ascobolus immersus* où des intermédiaires d'ADN bicaténaires symétriques et asymétriques ainsi que des événements de conversion génique et d'enjambement sont associés dans un même événement de recombinaison. Il explique aussi les résultats obtenus chez la levure où les intermédiaires asymétriques d'ADN bicaténaire contribuent plus à la conversion génique que les intermédiaires symétriques d'ADN bicaténaire, toutefois, certaines modifications doivent être apportées à ce modèle pour qu'il s'applique aux résultats obtenus par la suite où il a été démontré que l'enjambement et le site d'initiation de la recombinaison peuvent se produire du côté opposé ou du même côté que la conversion génique à laquelle ils sont associés; que la conversion génique peut se faire sur l'un ou l'autre des brins d'ADN; qu'il y a spécificité de brin pour la réparation des appariements erronés de bases et que l'ADN bicaténaire parental dont un brin participe à l'étape d'invasion, est celui qui reçoit l'information génétique. Un troisième modèle de recombinaison a été proposé par le Dr Jack W. Szostak et al. (1983) pour tenir compte de ces nouvelles observations.

1.1.2.1.3 Le modèle de Szostak et al. (1983)

Ce modèle propose que la recombinaison homologue est initiée par l'introduction d'une coupure bicaténaire d'ADN dans la molécule parentale receveuse (Double-Strand Break Repair Model: DSBRM; Figure 4a). Ce modèle se base sur la nature recombinogène des coupures bicaténaires d'ADN (Resnick, 1976) qui peuvent augmenter jusqu'à 1000 fois la fréquence de recombinaison homologue entre un plasmide et le chromosome chez la levure (Szostak et al., 1983). Par la suite, il a été démontré que les coupures bicaténaires d'ADN sont recombinogènes chez plusieurs autres organismes (Bollag et al., 1989). La coupure bicaténaire d'ADN peut être élargie en délétion par des exonucléases qui laissent des extrémités 3' monocaténaire (Figure 4b). Ce modèle implique la formation de deux régions d'intermédiaires asymétriques d'ADN bicaténaire. Le premier intermédiaire asymétrique d'ADN bicaténaire est dû à l'invasion par une des extrémités 3' qui amorce la synthèse d'ADN sur la molécule donneuse en déplaçant une boucle d'ADN monocaténaire (Figure 4c) à laquelle l'autre extrémité 3' de la coupure vient s'apparier pour former le second intermédiaire asymétrique d'ADN bicaténaire (Figure 4d) et amorcer un deuxième cycle de synthèse d'ADN (Figure 4e). Les deux intermédiaires d'ADN asymétriques flanquent la délétion dont la réparation résulte de la synthèse d'ADN. Après l'arrêt de la synthèse d'ADN, il y a formation de deux jonctions de Holliday (Figure 4e). La migration de ces deux jonctions peut entraîner la création d'intermédiaires symétriques d'ADN bicaténaire de part et d'autre des deux intermédiaires asymétriques d'ADN bicaténaire. Si la résolution

Modèle de Szostak et al.

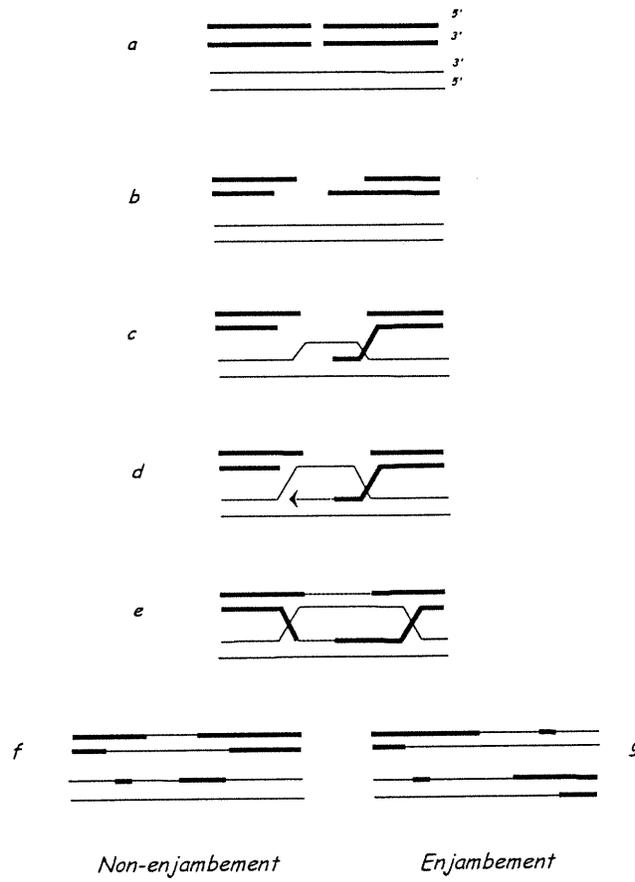


Figure 4: (Légende page suivante)

Figure 4 : Modèle de Szostak et al.

Modèle de recombinaison initiée par une cassure bicaténaire d'ADN dans une seule molécule d'ADN parentale. Selon ce modèle, une coupure bicaténaire d'ADN dans la molécule receveuse (a) est élargie pour former une délétion. La dégradation exonucléolytique des extrémités expose des régions 3' monocaténaire (b). Une de ces extrémités envahie la molécule d'ADN bicaténaire homologue donneuse et déplace une boucle d'ADN monocaténaire (c). La synthèse d'ADN est amorcée à cette extrémité et provoque un agrandissement de la boucle d'ADN monocaténaire (d). La synthèse d'ADN amorcée à la seconde extrémité 3' complète la réparation de la délétion (e). La migration des brins résulte en la formation de deux jonctions de Holliday et l'établissement d'intermédiaires d'ADN bicaténaire symétriques et asymétriques flanquant la délétion réparée. Ces intermédiaires de recombinaison peuvent être résolus de deux façons. Si les deux jonctions de Holliday sont coupés dans la même orientation, une configuration non-enjambement en résulte (f). Si les deux jonctions de Holliday sont coupées en orientations opposées, il en résultera une configuration enjambement (g). Selon ce modèle, la conversion génique peut se produire par réparation de la délétion et peut aussi résulter de la correction des intermédiaires d'ADN bicaténaire (f et g).

des deux jonctions se fait dans le même sens, ce qui se produit dans 50% des cas au cours de la méiose, il en résulte une conformation non-enjambement (Figure 4f) alors que la résolution des jonctions en sens opposés (50% des cas restants lors de la méiose) résulte en un enjambement associé à une conversion génique (Figure 4g). Avec ce modèle de réparation des coupures bicaténares d'ADN, la conversion génique peut se faire de deux façons; d'abord par la réparation de la délétion suite à l'acquisition de séquences à partir du brin bicaténaire donneur, ou encore par la correction des appariements erronés de bases dans les intermédiaires asymétriques ou symétriques d'ADN bicaténaire comme dans les modèles proposés par Dr Holliday et par les Drs Meselson et Radding. En accord avec le modèle proposé par Dr Szostak et al., des études récentes faites chez *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *C. elegans* ont clairement démontré que les cassures bicaténares d'ADN sont impliquées dans l'initiation des événements de recombinaison homologue méiotique (Cervantes et al., 2000; Dernburg et al., 1998; Vedel et Nicolas, 1999). Au cours de la mitose, les événements de recombinaison homologue qui sont initiés par une coupure bicaténaire d'ADN sont la commutation de « *mating-type* » (Haber, 1992) et la transposition des éléments P (Lankenau, 1995).

Le modèle de réparation des coupures bicaténares d'ADN prédit que la conversion génique résulte de la réparation d'une délétion or, il a été démontré récemment que la conversion génique provient presque exclusivement de la correction d'intermédiaires asymétriques d'ADN bicaténaire (Stahl, 1996). D'autres études ont aussi démontré que les coupures bicaténares d'ADN,

spontanées (Sun et al., 1991) ou induites artificiellement (Fishman-Lobell et al., 1992; Sugawara et Haber, 1992; White et Haber, 1990), n'étaient pas dégradées en délétion mais plutôt transformées en longues extrémités 3' monocaténares (Sun et al., 1991). Ces observations ont donc conduit à la modification du modèle de coupure bicaténaire d'ADN proposé par Dr Jack W. Szostak et al. (1983) (Sun et al., 1991; Nicolas et al., 1998).

Aussi les résultats obtenus chez la levure avec les locus ARG4 et Leu démontrent que les intermédiaires d'ADN bicaténaire ont toujours un côté asymétrique ce qui signifie qu'une seule des deux jonctions de Holliday peut migrer, contrairement à ce que propose le modèle de Dr Jack W. Szostak. D'autres résultats obtenus chez la levure sont aussi contradictoires avec le modèle puisqu'à la mitose, il y a moins de 50% des enjambements qui sont associés à des événements de conversion génique (Harris et al., 1993; Jinks-Robertson et al., 1993).

1.1.2.1.4 Le modèle de « *one sided invasion* » (Belmaaza et Chartrand 1994)

Ce modèle qui implique aussi une coupure bicaténaire d'ADN dans une des deux molécules d'ADN bicaténaire parentales (Figure 5a) propose qu'une seule des extrémités d'ADN générée par la coupure participe à l'étape d'invasion de la molécule donneuse (Figure 5b) où elle amorce la synthèse d'ADN (Figure 5c). La libération, par des hélicases, du brin nouvellement synthétisé puis son appariement à

Modèle de "one-sided invasion"

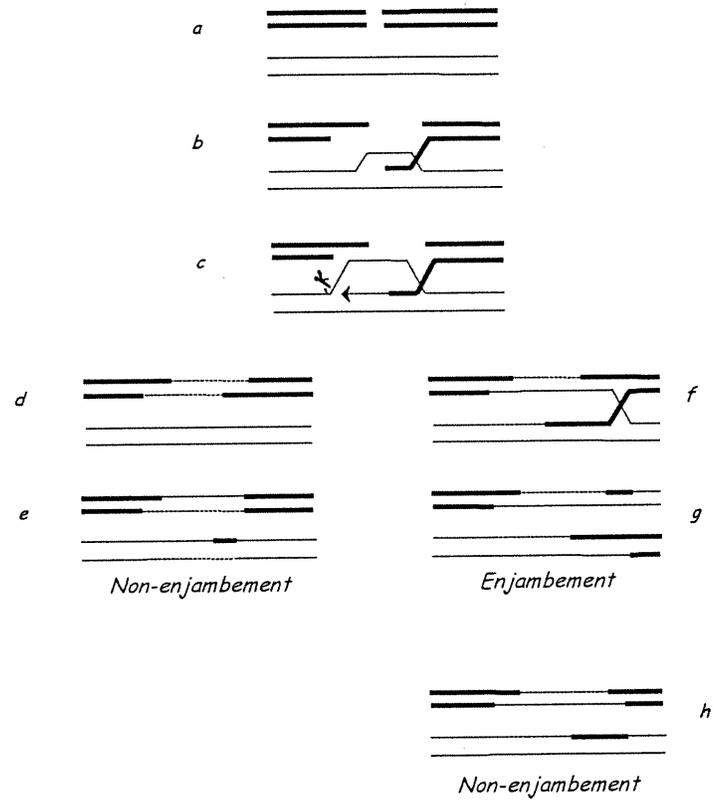


Figure 5: (Légende page suivante)

Figure 5 : Modèle de « *one-sided invasion* »

Selon ce modèle, une coupure bicaténaire d'ADN dans la molécule receveuse (a) initie la recombinaison. La dégradation exonucléolytique des extrémités, expose des régions 3' monocaténaires. Une de ces extrémités 3' envahie la molécule d'ADN bicaténaire parentale homologue qui est la molécule donneuse et déplace une boucle d'ADN monocaténaire (b). La synthèse d'ADN est amorcée à cette extrémité et provoque un agrandissement de la boucle d'ADN monocaténaire (c). La résolution de l'intermédiaire de recombinaison peut se faire par le déroulement du brin nouvellement synthétisé ou par son déplacement par la migration des brins d'ADN suivie de son union à l'extrémité non-invasive (d). La résolution peut aussi se faire par une seule coupure à une extrémité de la boucle d'ADN monocaténaire (ciseau, c) qui est appariée avec l'extrémité non-invasive, suivie de l'union des extrémités générées et la formation d'une jonction de Holliday (f) qui peut être résolue en conformation enjambement (g) ou non-enjambement (h).

l'extrémité qui ne participe pas à l'invasion, produisent un recombinant de conformation non-enjambement (Figure 5d). Dans le cas où l'extrémité de la cassure bicaténaire d'ADN qui ne participe pas à l'invasion s'apparie avec l'extrémité de la boucle d'ADN monocaténaire, formée sur la molécule envahie suite à la synthèse d'ADN (Figure 5c), elle peut amorcer à son tour la synthèse d'ADN et former une jonction de Holliday (Figure 5f). La résolution de cette jonction entraînera la formation d'un recombinant de conformation enjambement (Figure 5g) ou non-enjambement (Figure 5h) (Belmaaza et Chartrand, 1994). Contrairement au modèle de réparation des cassures bicaténaires d'ADN de Dr Szostak et al. (1983) où les deux extrémités de la cassure ont le même rôle, ici les deux extrémités ont des rôles différents (Belmaaza et Chartrand, 1994), une des deux extrémités envahit la molécule donneuse et l'autre est impliquée dans l'étape de résolution (Villemure et al., 1997).

D'autres résultats obtenus chez la levure (Orr-Weaver et Szostak, 1982), les mammifères (Aidaire et al., 1998; Belmaaza et al., 1990; 1994; Ellis et Bernstein, 1989; Mudgett et Taylor, 1990; Villemure et al., 1997), les plantes (Puchta et al., 1996) et la drosophile (Rubin et Levy, 1997) sont aussi contradictoires avec le modèle de Dr Szostak et al. (1983). Ces résultats indiquent que la recombinaison peut être divisée en deux types de produits où la réparation de la cassure qui peut être agrandie en délétion par des exonucléases dans la cellule, peut être précise ou imprécise. Dans le cas de réparation imprécise, la délétion peut être partiellement réparée (Belmaaza et al., 1990; 1994; Villemure et al., 1997) ou bien sa réparation

peut entraîner l'acquisition de séquences pouvant s'étendre au delà des régions d'homologie flanquant la délétion (Aidaire et al., 1989; Belmaaza et al., 1990; Ellis et Bernstein, 1989; Mudgett et Taylor, 1990; Villemure et al., 1997). Ces résultats peuvent être expliqués par le modèle de « *one-sided invasion* ». Selon que la synthèse est longue ou courte, le produit de recombinaison peut acquérir des séquences non-homologues qui se trouvent au-delà de la région d'homologie, ou encore seulement une partie des séquences manquantes, ce qui résulte dans les deux cas en une réparation imprécise de la délétion. Le modèle de « *one-sided invasion* » permet donc d'expliquer les recombinants possédant une jonction homologue du côté de l'extrémité impliquée dans l'invasion de la molécule d'ADN bicaténaire parentale homologue alors que la jonction se trouvant du côté de l'extrémité qui participe à l'étape de résolution de l'événement de recombinaison peut être homologue ou non-homologue (voir les encadrés de la figure 5d et 5e).

A la mitose, il existe d'autres types de recombinaison qui contribuent à la réparation des cassures bicaténares d'ADN: la recombinaison homologue non-conservatrice et la recombinaison non-homologue ou illégitime (« *non-homologous DNA end-joining* »: NHEJ; voir plus loin section 1.1.4).

1.1.3 RECOMBINAISON HOMOLOGUE NON-CONSERVATRICE

La recombinaison homologue non-conservatrice entraîne la perte de certaines séquences d'ADN de sorte que la recombinaison entre deux séquences parentales ne génère qu'une seule molécule dont la structure est recombinante.

1.1.3.1 Le modèle de « *single-strand annealing* »

Dans les cellules somatiques, les événements de recombinaison induits par cassure bicaténaire d'ADN sont réparés plus efficacement par recombinaison homologue non-conservatrice que par recombinaison homologue conservatrice tant chez les mammifères que chez la levure (revue dans Belmaaza et Chartrand, 1994). Afin d'expliquer ce processus, Lin et al. (1984; 1987) ont proposé le modèle d'appariement monocaténaire (Single-Strand Annealing [SSA] model) entre des régions d'homologie. Selon ce modèle, les extrémités d'ADN de part et d'autre de la coupure bicaténaire d'ADN, qui peut être ou non dans une région d'homologie (Figure 6b), sont rendues monocaténares soit par la dégradation exonucléique spécifique du brin 5' (Figure 6c) (Lin et al., 1984), soit par l'action d'une hélicase qui déroule l'ADN (Wake et al., 1985). Lorsque des séquences homologues sont présentes de part et d'autre de la coupure, des séquences monocaténares complémentaires sont exposées et peuvent s'apparier (Figure 6d).

Modèle de "single-strand annealing"

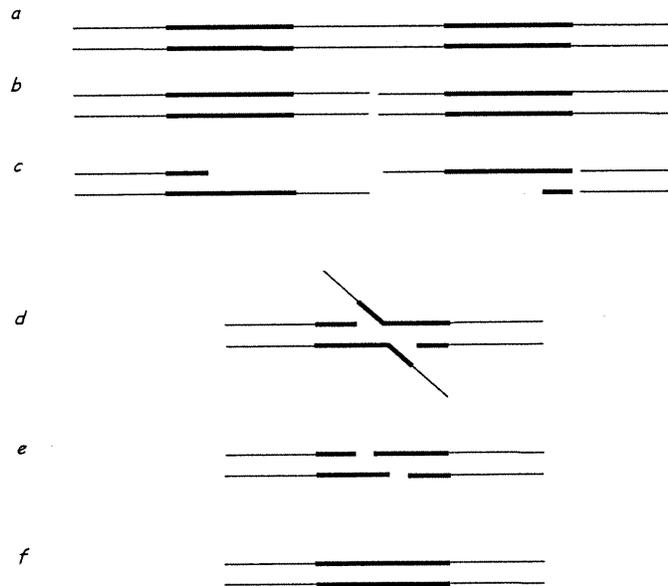


Figure 6:

Selon ce modèle, la coupure bicaténaire d'ADN peut être introduite dans l'homologie de séquence ou non (a et b). Les extrémités de la coupure sont dégradées par une exonucléase de spécificité 5'→3' pour exposer les séquences homologues flanquants la coupure bicaténaire d'ADN (c). L'appariement des extrémités 3' monocaténares complémentaires (d), l'enlèvement des extrémités non appariées (e) et l'union des extrémités résultantes (f) permettent la formation d'une jonction homologue non-conservative (f) accompagnée de la perte d'une des deux séquences homologues impliquées et des séquences situées entre elles.

Suite à cet appariement, les extrémités 3' monocaténares qui dépassent (Figure 6d) sont éliminées par des nucléases spécifiques (Karran, 2000). La synthèse d'ADN (Figure 6e) et l'union des extrémités par une ligase viennent compléter la formation d'une jonction homologue non-réciproque (Figure 6f).

Le modèle d'appariement monocaténaire est particulier puisqu'il n'implique pas d'étape d'invasion, ni la formation ou la migration d'une jonction de Holliday. Il ne nécessite que la formation d'un intermédiaire d'ADN bicaténaire (Deng et Nicholoff, 1994; Desautels et al., 1990). Le modèle d'appariement monocaténaire ne génère que des recombinants de type enjambement et au cours d'un événement de recombinaison homologue impliquant des séquences d'ADN en répétition directe, soit sur un plasmide ou un chromosome, il est difficile de discriminer entre un enjambement de type conservateur ou non-conservateur si tous les produits de recombinaison ne sont pas récupérés.

1.1.4 LA RECOMBINAISON ILLÉGITIME

La réparation de cassures bicaténares d'ADN par recombinaison illégitime (NHEJ ou « *non homologous end joining* »; Jackson et Jeggo, 1995) consiste à réunir les deux extrémités de la cassure par un processus qui ne nécessite pas d'homologie de séquence à chaque extrémité de la cassure. La formation d'une jonction entre les extrémités d'ADN par recombinaison illégitime peut parfois être

précise mais généralement elle est imprécise et entraîne la perte ou l'addition de nucléotides.

Chez la levure *S. cerevisiae*, la réparation des cassures bicaténares d'ADN se fait principalement par recombinaison homologue (revue dans Resnick, 1995) alors que chez les mammifères, on pensait que la recombinaison non-homologue ou illégitime prévalait sur la recombinaison homologue (Derbyshire et al., 1994; Roth et Wilson, 1988) pour la réparation des cassures bicaténares d'ADN. Toutefois, des études récentes indiquent que la recombinaison homologue est aussi un mécanisme majeur de la réparation des cassures bicaténares d'ADN chez les mammifères (Liang et al., 1996, 1998; Rouet et al., 1994, Sargent et al., 1997).

Puisque les cassures bicaténares d'ADN sont préférentiellement réparées par recombinaison homologue en fin de phase S et en phase G₂ du cycle cellulaire, lorsque la chromatine sœur est présente, les effets d'une déféctuosité de la recombinaison illégitime sont plus apparents en phase G₁ et en début de phase S. Une telle déféctuosité du mécanisme de recombinaison illégitime confère alors une déféctuosité de la réparation des cassures bicaténares d'ADN qui se traduit par une augmentation de la sensibilité des cellules aux radiations ionisantes. Une déféctuosité du processus de recombinaison homologue rend pour sa part les cellules totalement inaptes à réparer leur cassures bicaténares d'ADN, les rendant fortement sensibles aux radiations ionisantes et entraîne la mort au stade embryonnaire (Luo et al., 1999).

1.1.5 LES ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LA RECOMBINAISON MITOTIQUE

1.1.5.1 Les enzymes de recombinaison homologue conservatrice:

Chez la levure *S. cerevisiae*, la recombinaison conservatrice nécessite les enzymes du groupe épistasique de Rad52 incluant Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59, Mre11 et Xrs2 qui agissent en association avec la protéine RPA (« *replication protein A* ») et apparemment les trois polymérases impliquées dans la réplication ainsi que les facteurs qui leur sont associés. La mutation de n'importe lequel de ces gènes chez la levure n'a pas d'effet sur la viabilité mais provoque une forte sensibilité aux agents qui induisent les cassures bicaténares d'ADN. La protéine Rad51 de *S. cerevisiae* qui est homologue à la protéine RecA de *E. coli*, catalyse l'échange de brins dans une réaction qui est stimulée par Rad52 et RPA (Benson et al., 1998; New et al., 1998). Les protéines Rad51, Rad52, Rad55 et Rad57 interagissent ensemble. Rad52, en association avec Rad55 et Rad57, déplace la protéine RPA, qui est une protéine de liaison de l'ADN monocaténaire, pour faciliter l'accès à l'ADN par Rad51 qui participe subséquentement à l'échange de brins (New et al., 1998; Sung, 1997). Chez la souris, l'inactivation de Rad51 est létale dès le stade embryonnaire (Lim et Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996) et ne permet pas de déterminer directement le rôle de cette protéine chez les mammifères. Cependant, des études ont montré certains rôles de Rad51 qui sont liés à la recombinaison homologue. D'abord, la protéine Rad52 humaine stimule l'échange de brins *in vitro* par la protéine hRad51 (Benson

et al., 1998). La surexpression de la protéine Rad51 entraîne une augmentation de la réparation des cassures bicaténares d'ADN par recombinaison homologue. Les cellules de mammifères déficientes pour deux autres homologues de Rad51, Xrcc2 et Xrcc3 qui interagissent avec Rad51, ont des défauts de réparation par recombinaison homologue (Johnson et al., 1999; Liu et al., 1998; Pierce et al., 1999). Aussi, suite à des dommages à l'ADN, la protéine Rad51 de souris, en présence de Rad54 (Tan et al., 1999), forme des foci sur l'ADN qui correspondent probablement à des sites actifs de réparation de l'ADN. Ces observations indiquent que chez les mammifères, la voie de Rad51 serait impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN par recombinaison homologue et dans la cancérogénèse (Gonzalez et al., 1999; Hiramoto et al., 1999; Matsuda et al., 1999; Schoenmaker et al., 1999).

Les souris Rad52 ou Rad54 négatives sont viables et fertiles (Rijkers et al., 1998). Les cellules souches embryonnaires provenant de souris Rad52 négatives bien que déficientes en recombinaison, ne sont apparemment pas hypersensibles à la présence de cassures bicaténares d'ADN alors que celle provenant de souris Rad54 négatives le sont (Essers et al., 1997). Il semble donc que les fonctions des membres de la famille Rad52 ne soient pas exactement les mêmes chez les mammifères et chez la levure.

Mre11 possède plusieurs activités dont la plus importante est probablement son activité exonucléase 5'-3' d'ADN bicaténaire qui pourrait éliminer des

appariements erronés de bases aux extrémités de l'ADN et exposer de courtes régions d'ADN monocaténares pour permettre la recherche d'homologie (revue dans Karran, 2000). Rad50 est une protéine de liaison à l'ADN. Les protéines humaines Rad50 et Mre11 forment des foci suite à l'irradiation des cellules. Ces foci qui semblent être des sites de cassures bicaténares d'ADN, ne sont formés que si les deux protéines qui ont une activité endonucléase, sont activées par la phosphorylation qui dépend de Mre11 et Nbs1 (Carney et al., 1998; Dong et al., 1999; 1998 Stewart et al., 1999), l'homologue humain de Xrs2 de *S. cerevisiae*.

La protéine humaine Nbs1 est l'homologue fonctionnel de la protéine Xrs2 de *S. cerevisiae* (Karan, 2000) qui est impliqué dans la recombinaison mitotique et méiotique, notamment dans la formation des cassures bicaténares d'ADN (revue dans Smith et Nicolas, 1998). La mutation du gène NBS est associée au syndrome de Nijmegen (« *Nijmegen breakage syndrome* », NBS; revue dans Digweed et al., 1999) et les cellules des patients NBS possèdent plusieurs des caractéristiques associées à une défectuosité de la réparation des cassures bicaténares d'ADN: elles sont sensibles aux radiations ionisantes, ont des déficiences immunitaires, de l'instabilité chromosomique et une prédisposition pour les tumeurs lymphoréticulaires (revue dans Karan, 2000). Cependant, ces cellules ne manifestent pas de défectuosités pour la réparation des cassures bicaténares d'ADN, donc ce gène semble être impliqué dans une voie de signalisation plutôt que de réparation.

L'inactivation de mRad50 ou mMre11 chez la souris est létale au stade embryonnaire (Luo et al., 1999). Les cellules embryonnaires mRad50^{-/-} sont extrêmement sensibles aux radiations ionisantes et meurent durant la culture normale *in vitro*. De façon similaire, les cellules mMre11^{-/-} sont non-viables et les cellules de poulet dans lesquelles Mre11 est conditionnellement inactivé subissent un arrêt de prolifération (Yamaguchi-Iwai et al., 1999). Ces cellules montrent aussi de hauts niveaux d'instabilité chromosomique et ont une capacité réduite de réparation des cassures bicaténares d'ADN par recombinaison homologue. La différence de sévérité des phénotypes des cellules nbs et rad50/mre11 reflète probablement l'implication de Rad50/Mre11 dans les processus de réparation des cassures bicaténares d'ADN par recombinaison homologue conservatrice et non-conservatrice (Karran, 2000).

Les produits des gènes suppresseurs de tumeur BRCA1 et BRCA2, humains et murins, semblent aussi être impliqués dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue conservatrice. La mutation de ces gènes est associée avec l'apparition précoce du cancer du sein et/ou de l'ovaire chez l'humain. BRCA1 et BRCA2 interagissent physiquement avec Rad51 *in vivo* et *in vitro* (Mizuta et al., 1997; Scully et al., 1997; Sharan et al. 1997; Wong et al., 1997). Une fraction de hRad51 colocalise avec BRCA1 et BRCA2 dans les cellules mitotiques et suite aux dommages à l'ADN, les trois protéines sont localisées avec PCNA sur des structures qui représentent probablement des sites actifs de réparation (Chen et al., 1998). La perte de fonction de ces protéines résulte en une augmentation de la

sensibilité aux radiations et aux composés chimiques (Cortez et al., 1999; Gowen et al., 1998; Zhong et al., 1999) et entraîne le développement d'aberrations chromosomiques (Patel et al., 1998).

1.1.5.2 Les enzymes de recombinaison homologue non-conservatrice

Chez la levure, la recombinaison non-conservatrice est indépendante de Rad51 et requiert les protéines Mre11, Rad50 et Xrs2 du groupe épistasique de Rad52 ainsi que les protéines du système de réparation des appariements erronés de bases (MMR: « *Mismatch Repair* ») Msh2 et Msh3 et les protéines du système de réparation par excision de nucléotide (NER: « *Nucleotide Excision Repair* ») Rad1 et Rad10 (Karran, 2000).

Pendant la recombinaison homologue non-conservatrice (SSA), les extrémités 3' d'ADN monocaténaire créées par la résection mais ne faisant pas partie de l'intermédiaire d'ADN bicaténaire formé par l'appariement des extrémités de la cassure bicaténaire d'ADN (Figure 6d), doivent être éliminées pour permettre l'étape d'union catalysée par une ligase. Cette élimination est possible grâce à l'activité endonucléolytique du complexe Rad1/Rad10 de *S. cerevisiae* dont XPF/Ercc2 est l'homologue humain. En plus de Rad1/Rad10, les protéines de levure Msh2 et Msh3 du système de MMR sont aussi impliquées dans la coupure des extrémités 3' monocaténaire qui sont relativement courtes (Pâques et Haber, 1997; Sugawara et al., 1997).

1.1.5.3 Les enzymes de recombinaison illégitime

La recombinaison illégitime (NHEJ) fait intervenir la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK; Jeggo, 1997), sa sous-unité de liaison à l'ADN qui est un hétérodimère composé des protéines Ku70 et Ku80 (Mimori et Hardin, 1986; Mimori et al., 1990; Yaneva et al., 1997) ainsi que l'hétérodimère ligase IV/Xrcc4 (Xrcc: « *X-ray cross-complementing* »; Critchlow et al., 1997; Grawunder et al., 1997; Li et al., 1995; Wilson et al., 1997). L'hétérodimère Ku70/Ku80 se fixe aux extrémités d'ADN de la cassure bicaténaire d'ADN et les protège de la dégradation. La liaison de Ku70/Ku80 à l'ADN active la sous-unité catalytique de la protéine kinase (DNA-PK) tout en stabilisant son interaction avec les extrémités d'ADN pour faciliter leur union par l'hétérodimère ligase IV/Xrcc4. La défectuosité de l'une ou l'autre des composantes de ce processus de recombinaison illégitime rend les cellules sensibles aux radiations ionisantes et la défectuosité de la recombinaison V(D)J (Gu et al., 1997; Nussenzweig et al., 1996; Ouyang et al., 1997; Smider et al., 1994; Taccioli et al., 1994; Zhu et al., 1996). De plus, l'inactivation de la ligase IV ou de Xrcc4 provoque aussi la mortalité au stade embryonnaire, suggérant un rôle supplémentaire pour cet hétérodimère au cours du développement embryonnaire (Barnes et al., 1998; Frank et al., 1998; Gao et al., 1998). Chez la levure *S. cerevisiae*, des homologues de Ku70, Ku80 et de la ligase IV ont été identifiés et participent aussi à la réparation des cassures bicaténaires d'ADN (Feldmann et Winnacker, 1993; Milne et al., 1996; Teo et Jackson, 1997).

De plus, il a été montré que l'hétérodimère Ku70/Ku80 interagit avec la protéine WRN (Li et Comai, 2000) dont la mutation cause le syndrome de Werner caractérisé par un vieillissement prématuré et une incidence élevée de formation de différents types de tumeurs. L'interaction de WRN et Ku70/Ku80 a pour effet d'altérer et de stimuler la fonction exonucléase de la protéine WRN. Ceci pourrait permettre à la protéine WRN d'agir sur les extrémités de cassures bicaténares d'ADN pour faciliter leur réparation par recombinaison illégitime.

1.2 STABILITÉ GÉNOMIQUE

La recombinaison homologue est un processus indispensable pour assurer la ségrégation des chromosomes et la diversité génétique lors de la méiose et aussi pour réparer les cassures bicaténares d'ADN lors de la mitose. Cependant, la recombinaison homologue peut devenir néfaste pour la cellule si elle se produit par enjambement entre des séquences non-alléliques. Selon que les séquences non-alléliques impliquées sont placées sur le même chromosome en orientation directe ou inverse, portées par deux chromatides sœurs ou par deux chromosomes différents, les événements d'enjambement entraînent des délétions, inversions, amplifications ou translocations de séquences (Figure 7). De tels réarrangements qui compromettent la stabilité du génome en modifiant l'expression de gènes régulateurs importants comme des suppresseurs de tumeur ou des oncogènes, sont caractéristiques de presque toutes les cellules cancéreuses humaines

Réarrangements chromosomiques

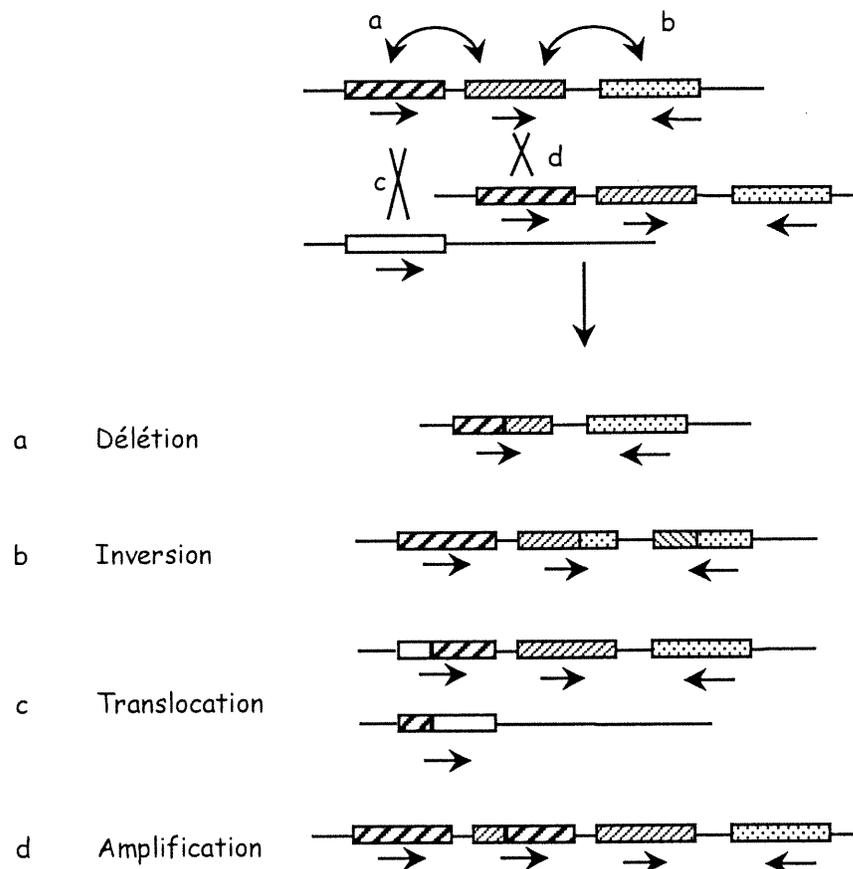


Figure 7:

La recombinaison réciproque (enjambement) entre des séquences d'ADN non alléliques entraîne des délétions si les séquences sont en répétition directe sur le même chromosome (a) alors que les répétitions inversées provoquent une inversion des séquences situées entre les points d'échange (b). L'échange réciproque entre des séquences portées par des chromosomes différents, résulte en une translocation (c) alors que la recombinaison entre des séquences situées sur les chromatides sœur d'un chromosome peut entraîner une amplification du nombre de copie d'une séquences (d) et une délétion (a).

(revue par deWind et al., 1995; Jeffs et al., 1998; Labuda et al., 1995; Morris et al., 1996; Schwab, 1998). Malgré la présence d'un très grand nombre de séquences homologues non-alléliques qui occupent près de 35% des séquences génomiques (Smith, 1996), le génome des mammifères demeure tout de même relativement stable, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme qui contrôlerait la recombinaison homologue. La nature de ce mécanisme de contrôle n'est pas connue chez les mammifères mais il a été suggéré que l'homologie de séquence, le système de MMR et l'activité anti-recombinogénique de p53 pourraient contrôler la recombinaison homologue entre les séquences répétitives et assurer la stabilité du génome.

1.2.1 Contrôle de la recombinaison homologue par l'homologie de séquence

Chez tous les organismes étudiés une corrélation entre le degré d'homologie ou la longueur des séquences homologues et l'efficacité de recombinaison homologue a été observée. Ainsi, pour que la recombinaison homologue procède de façon efficace, un minimum d'homologie entre les séquences impliquées est nécessaire. La notion de « *MEPS value* » (*minimal efficient processing segment*; Shen et Huang, 1986) permet de désigner la longueur d'homologie minimale qui est requise pour qu'un événement de recombinaison homologue se produise. Selon Shen et Huang (1986), le taux de recombinaison homologue entre des séquences d'ADN est proportionnel au nombre total d'unités MEPS partagées par les deux séquences. La valeur de MEPS varie selon les organismes et elle est de 30 paires de bases (pb) pour les bactéries alors que pour les levures (Jinks-Robertson et al.,

1993) et les mammifères il faut environ 250 pb d'homologie (Liskay et al., 1987). Chez les mammifères, le taux de recombinaison homologue intrachromosomique est directement proportionnel à la longueur de l'homologie ininterrompue entre 295 et 1800 pb mais diminue de façon abrupte entre 295 et 200 pb pour finalement être non-détecté lorsque l'homologie est de seulement 95 pb (Liskay et al., 1987; Waldman et Liskay 1988). Par contre avec des essais intermoléculaires impliquant des plasmides, donc dans des conditions où l'efficacité de recombinaison est plus élevée qu'au niveau chromosomique, environ 200 pb sont nécessaires pour une recombinaison homologue efficace. Des événements de recombinaison ont toutefois pu être détectés à une fréquence très faible avec aussi peu que 14 pb d'homologie ininterrompue chez les mammifères (Rubnitz et Subramani, 1984).

La diminution de l'homologie par l'augmentation de la divergence de séquence a un effet plus important de prévention de la recombinaison que la diminution de la longueur d'homologie ininterrompue (Shen et Huang, 1986). Chez la bactérie, une divergence de 16% entre les séquences entraîne une diminution de la fréquence de recombinaison phage-plasmide de 100 fois (Shen et Huang, 1986) et chez les mammifères, une divergence de 19% entre les séquences diminue de plus de 1 000 fois le taux de recombinaison homologue intrachromosomique mais de seulement 3 à 15 fois le niveau de recombinaison plasmidique (Waldman et Liskay, 1988). Même une faible divergence entre les séquences, de 1% ou moins, peut causer une sévère inhibition de la recombinaison chez la bactérie, la levure et les

mammifères (Datta et al., 1996, 1997; deWind et al., 1995; Vulic et al., 1997; Zahrt et Maloy, 1997).

Ces études ont permis de proposer que chez les mammifères, la divergence qui existe entre les séquences répétitives intercalaires permettrait de contrôler leur capacité d'échanger l'information génétique par recombinaison homologue. Chez la bactérie et la levure, l'effet inhibiteur de la recombinaison homologue par la divergence entre les séquences est grandement due au système de réparation des appariements erronés de bases (Alani et al., 1994; Datta et al., 1996, 1997; Nicholson et al., 2000; Petit et al., 1991; Porter et al., 1996; Rayssiguier et al., 1989).

1.2.2 LE SYSTÈME DE RÉPARATION DES APPARIEMENTS ERRONÉS DE BASES

Le système de réparation des appariements erronés de bases (« *mismatch repair* »: MMR) est un mécanisme général qui reconnaît et corrige divers appariements erronés de bases qui se définissent comme étant des paires de bases non-complémentaires, mal appariées ou non-appariées, dans une molécule d'ADN bicaténaire. Contrairement aux dommages à l'ADN, les appariements erronés de bases comportent des bases chimiquement normales et ils peuvent être générés *in vivo* par trois mécanismes : (1) lors de la réplication suite à des erreurs de synthèse effectuées par l'ADN polymérase, (2) lors de la recombinaison génétique suite à l'échange de brins entre des séquences d'ADN homologues divergentes ou (3) suite

à la déamination spontanée de la 5-méthylcytosine en thymine qui génère appariements erronés de bases G-T.

1.2.2.1 Le système de MMR chez *E. coli*:

La purification de différentes souches de bactéries *E. coli* au phénotype mutateur c'est-à-dire ayant des fréquences élevées de mutation spontanée, a permis d'identifier quatre gènes *mut* (« *mutator* » ou mutateur) ayant des rôles clés dans la réparation des appariements erronés de bases: MutS, MutL, MutH et MutU (Figure 8).

MutS est une ATPase qui agit sous forme d'homodimère et qui est responsable de reconnaître et fixer les appariements erronés de bases, qu'il s'agisse d'une paire de dont l'appariement est erroné, d'une délétion ou d'une insertion de 1 à 4 nucléotides non-appariés ou encore d'une paire de bases formant un adduit qui auraient échappés à la fonction de correction d'épreuves associée à la polymérase responsable de la réplication de l'ADN (Modrich, 1991; Modrich et Lahue, 1996).

La discrimination entre le brin d'ADN servant de matrice et le brin nouvellement répliqué est possible grâce à l'endonucléase MutH qui introduit une coupure monocaténaire d'ADN dans le brin nouvellement synthétisé, en 5' de la séquence 5'-GATC-3' hémi-méthylée située le plus près l'appariement erronés de

Mécanisme de réparation des appariements erronés de bases de *E. coli*

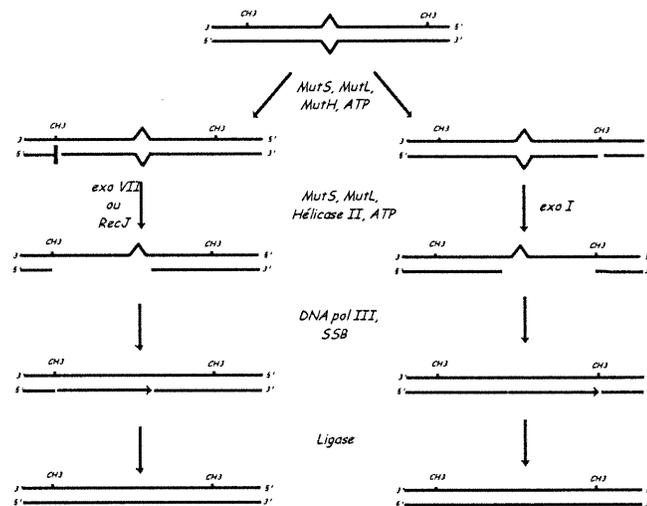


Figure 8:

La protéine MutS reconnaît et fixe les appariements erronés de bases. La protéine MutL stimule l'activité de MutS et permet d'activer la protéine MutH. Les activités de MutS et MutL requièrent l'hydrolyse de l'ATP. La forme activée de MutH coupe le brin d'ADN à réparer près d'une séquence dGATC hémiméthylée qui peut être d'un côté ou de l'autre de l'appariement erroné de bases. Ensuite des exonucléases (exo VII, RecJ ou exo I) excisent le fragment d'ADN qui inclut l'appariement erroné de bases et la séquence dGATC. Ensuite l'ADN polymérase III et la ligase complètent l'événement de réparation.

bases (Au et al., 1992; Hall et Matson, 1999). Le tétranucléotide 5'-GATC-3' est la séquence cible de la dam méthylase de *E. coli*. Suite à la réplication de l'ADN, le brin nouvellement synthétisé est temporairement non-méthylé jusqu'au moment où la dam méthylase agit. Ce délai dans le processus de la méthylation permet à l'enzyme MutH de discriminer entre le brin d'ADN parental et le brin nouvellement synthétisé qui contient l'erreur de réplication et sur lequel elle introduira une coupure pour permettre sa correction.

La protéine MutL ayant un rôle de « rassembleur » (*matchmaker*) (Sancar et Hearst, 1993) permet de coupler la reconnaissance des appariements erronés de bases avec les événements subséquents de la réparation de différentes façons. Premièrement, un homodimère de MutL forme un complexe avec MutS (Galio et al., 1999; Grilley et al., 1989; Wu et Marinus, 1999) et stimule sa translocation qui est dépendante de l'hydrolyse de l'ATP (Allen et al., 1997; Modrich et Lahue, 1996). Cette translocation permet probablement d'effectuer la recherche du signal de discrimination des deux brins d'ADN. La formation d'une structure en boucle α de l'ADN, suite à la translocation, suggère que le complexe MutSL se déplacerait sur l'ADN de façon à ce que chaque sous-unité du complexe, formée d'un monomère de MutS et de MutL, s'éloigne de l'appariement erroné en direction opposée (Allen et al., 1997). Un modèle alternatif suggère que l'ADP stabiliserait la liaison du complexe MutSL à l'ADN alors que l'ATP en favoriserait la dissociation (Gradia et al., 1997). Deuxièmement, MutL en hydrolysant l'ATP, permet la

stimulation de l'activité endonucléase de MutH pour qu'elle introduise, sur le brin nouvellement synthétisé, la coupure nécessaire à la réparation (Au et al, 1992; Ban et Yang, 1998a, 1998b; Hall et Matson, 1999). Finalement, MutL est nécessaire pour charger l'hélicase MutU (hélicase II qui est le produit du gène UvrD) au site de coupure effectuée par MutH, pour faciliter le déroulement de l'ADN et l'enlèvement exonucléolytique du fragment à réparer sur le nouveau brin d'ADN (Dao et Modrich, 1998; Hall et al., 1998; Yamaguchi et al., 1998).

L'étape d'excision du système de MMR qui se fait à partir de l'incision faite par MutH jusqu'à une centaine de nucléotides après l'appariement erroné de bases et dont la direction est communiquée par l'interaction entre l'hélicase II et le complexe MutSL, nécessite une des quatre exonucléases, RecJ, ExoVII, ExoI ou ExoX (Modrich et Lahue, 1996; Viswanathan et Lovett, 1998).

Ensuite, la protéine SSB (« *Single Strand Binding Protein* »), l'ADN polymérase III et une ligase sont nécessaires pour la resynthèse qui peut s'étendre sur plus de 1 kpb, et l'union des extrémités pour compléter l'événement de réparation (Modrich, 1991; Modrich et Lahue, 1996).

1.2.2.2 Le système de MMR chez les eucaryotes

Les systèmes de MMR de la levure et des mammifères ressemblent beaucoup à celui de la bactérie mais sont plus complexes. L'existence de plusieurs

homologues de MutS et de MutL reflète une grande conservation du processus de réparation mais aussi une spécialisation et une redondance des fonctions des protéines de MMR.

1.2.2.2.1 La reconnaissance des appariements erronés de bases par les homologues de MutS:

Six homologues de MutS ont été identifiés chez les eucaryotes (« *MutS Homologue* »: Msh1-6) mais seulement trois semblent être impliqués dans le système de MMR. Msh2, Msh3 et Msh6 forment deux hétérodimères, MutS α (Msh2 et Msh6) et MutS β (Msh2 et Msh3), qui reconnaissent les appariements erronés de bases dans l'ADN (Acharya et al., 1996; Drummond et al., 1995; Habraken et al., 1996; Hughes et Jiricny, 1992; Marsischky et al., 1996). MutS α reconnaît préférentiellement les appariements erronés d'une seule base et les insertions ou délétions d'une base alors que MutS β reconnaît les appariements erronés d'une seule base ainsi que les insertions ou délétions de 2 à 4 bases (Figure 9). La principale activité de reconnaissance des appariements erronés de bases se fait par MutS α dans les cellules humaines bien que le chevauchement de spécificité de liaison de MutS α et MutS β suggère des rôles partiellement redondants durant la réparation.

Le système de MMR chez les eucaryotes

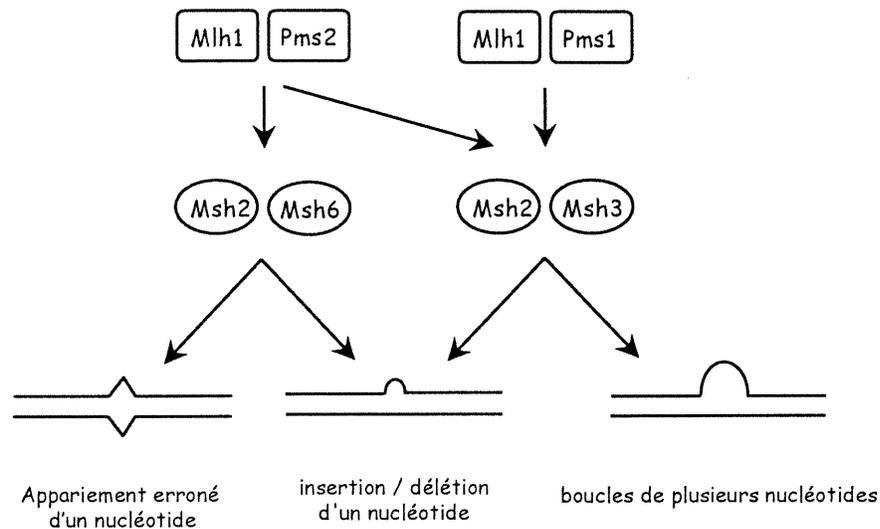


Figure 9:

Les protéines Msh2, Msh3 et Msh6, des homologues eucaryotes de la protéine MutS de *E. coli*, peuvent former deux hétérodimères. Le complexe Msh2-Msh6 est responsable de la réparation de l'appariement erroné d'un nucléotide, les complexes Msh2-Msh6 et Msh2-Msh3 sont redondants pour la réparation des insertion/délétion d'un nucléotide et le complexe Msh2-Msh3 est responsable de la réparation des boucles de plusieurs nucléotides non appariés. Les homologues de MutL, Mlh1, hPms1 et hPms2 peuvent aussi former des hétérodimères et ceux-ci interagissent avec les complexes de Msh fixés à l'ADN. Le complexe Mlh1-Pms2 peut interagir avec les deux complexes Msh2-Msh3 et Msh2-Msh6 alors que Mlh1-Pms1 n'interagit qu'avec Msh2-Msh3.

1.2.2.2.2 Rôle des homologues de MutL dans le MMR

Plusieurs homologues eucaryotes de MutL ont été identifiés chez la levure et les mammifères. Tout comme pour les homologues de MutS, les homologues de MutL, Mlh1 (*MutL Homologues*) et Pms2 (Pms1 chez la levure; PMS: *Post Meiotic Segregation*) et Pms1 (Mlh3 chez la levure) peuvent interagir pour former deux hétérodimères, MutL α (Mlh1 et Pms2: Guerrette et al., 1999; Li et Modrich, 1995, Prolla et al., 1994) et MutL β (Mlh1 et Pms1). La principale activité MutL pour la correction des appariements erronés de bases est due à MutL α alors que MutL β n'a qu'un rôle mineur selon des études génétiques et biochimiques faites chez la levure (Flores-Rozas et Kolodner, 1998; Kramer, et al., 1989; Prolla et al., 1994) et les mammifères (Li et Modrich, 1995; Prolla et al., 1998) (Figure 9). Un autre homologue de MutL, Mlh2, identifié seulement chez la levure, n'a pas de rôle dans la prévention des mutations (Flores-Rozas et Kolodner, 1998) mais augmenterait plutôt la cytotoxicité de certains agents anti-cancéreux chez la levure (Durant et al, 1999). Une famille de gènes humains avec de l'homologie pour la partie N-terminale de Pms2 a aussi été décrite (Horii et al., 1994; Kondo et al., 1999; Nicolaidis et al., 1995) mais de tel gènes n'ont pas été identifiés chez la souris et apparemment leurs produits n'interagissent pas avec la protéine Mlh1 humaine (Kondo et al., 1999), leur fonction demeure encore inconnue.

Des études récentes ont commencé à fournir des indices quant au rôle de MutL α dans la réparation des appariements erronés de bases. MutL α peut interagir avec Msh2 (Prolla et al., 1994), MutS α (Habraken et al., 1998), MutS β (Habraken et al., 1997) et PCNA, l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA: proliferating cell nuclear antigen) (Gu et al., 1998; Umar et al., 1996). Ceci est consistant avec l'assemblage d'un complexe multiprotéique durant le processus de MMR. Donc, comme pour le système de MMR de *E. coli*, le complexe MutS/MutL eucaryotes peut recruter les joueurs additionnels au site de réparation avec MutL α , par analogie à la bactérie, qui couplerait la reconnaissance de l'appariement erroné avec la discrimination des brins, l'excision et la resynthèse. L'activité probable de couplage de l'hétérodimère MutL α pourrait dépendre de l'activité de liaison et/ou d'hydrolyse de l'ATP tel que prédit pour les extrémités N-terminales hautement conservées de Mlh1 et Pms2 (Ban et Yang, 1998a).

1.2.2.2.3 La discrimination des brins

Le mécanisme de discrimination des brins *in vivo* pour tous les organismes autres que *E. coli* et *S. pneumoniae* n'est pas connu. Par contre la discontinuité d'un brin dans un plasmide contenant un appariement erroné dirige la réparation *in vitro* sur le brin coupé (Holmes et al., 1990, Thomas et al., 1991), soulevant la possibilité que la discontinuité des brins puisse marquer le brin naissant durant la répllication *in vivo* comme c'est le cas chez *S. pneumoniae* (Radman, 1988).

Certaines études chez la levure et les mammifères ont impliqué PCNA dans la réparation des appariements erronés. D'abord, PCNA peut interagir avec les homologues humains ou de levure de MutS et MutL (Gu et al., 1998; Johnson et al., 1996, Umar et al., 1996). Ensuite des analyses génétiques effectuées chez la levure indiquent que des mutations de PCNA peuvent favoriser les changements de cadre de lecture dans des séquences répétées simples via l'inhibition du système de MMR (Johnson et al., 1996, Kokoska et al., 1999; Umar et al., 1996). Et finalement, dans des extraits cellulaires humains, PCNA est requis tôt dans le processus de MMR, soit avant ou pendant l'étape d'excision (Gu et al., 1998; Umar et al., 1996), de même que pendant l'étape de resynthèse (Gu et al., 1998). Ensemble, ces résultats nous amènent à proposer un modèle dans lequel PCNA agirait pour coupler le complexe protéique du système de MMR à celui de l'ADN polymérase au site de la fourche de réplication, facilitant probablement la reconnaissance et la réparation du brin nouvellement synthétisé (Umar et al., 1996). Aussi, une endonucléase humaine, MED1, a été proposée comme homologue fonctionnel de MutH. Cette endonucléase qui lie l'ADN méthylé, interagit avec Mlh1 et sa surexpression cause l'instabilité des microsatellites (Bellacosa et al., 1999).

1.2.2.2.4 L'excision et la resynthèse d'ADN

Chez la levure trois exonucléases seraient impliquées dans le processus de MMR, ExoI et les exonucléases correctrices d'épreuve des polymérases d'ADN δ et

ε. ExoI est une exonucléase 5'-3' qui a été identifiée chez *S. pombe* et qui est impliquée dans la prévention des mutations. Des études chez *S. cerevisiae* ont montré que ExoI interagit avec Msh2 (Tishkoff et al., 1997) et que son inactivation entraîne un phénotype mutateur faible (Tishkoff et al., 1997; Tran et al., 1999). Un homologue humain de ExoI, ExoI/HexI, qui interagit avec Msh2 (Schmutte et al., 1998) a aussi été identifié (Qiu et al., 1999; Schmutte et al., 1998; Tishkoff et al., 1998; Wilson et al., 1998). Il semble que les exonucléases de la fonction de correction d'épreuve des polymérase δ et ϵ soient redondantes avec l'activité d'ExoI (Tran et al., 1999). L'inactivation combinée d'ExoI et des fonctions d'exonucléases des deux polymérases cause une augmentation synergique du taux de mutation comparable à l'augmentation observée chez les mutants du système de MMR (Tran et al., 1999).

La resynthèse du fragment excisé semble procéder par l'action concertée de la polymérase δ et probablement d'autres polymérases sensibles à l'aphidicoline (Modrich, 1997; Thomas et al., 1991), ainsi que de PCNA et la protéine de réplication A (RPA). La ligase qui complète l'événement de réparation n'a pas encore été identifiée.

1.2.2.2.5 L'implication des protéines de MMR dans la recombinaison méiotique

Plusieurs protéines du système de MMR sont impliquées dans la recombinaison méiotique tant chez la levure que chez les mammifères (revue par Chambers et al., 1996; Kolodner, 1996; Modrich et Lahue, 1996). L'inactivation de Msh5 chez la souris entraîne la stérilité et une défectuosité de la formation de la synapse lors de la prophase I (de Vries et al., 1999; Edelman et al., 1999) et suggère que cet homologue de MutS participe aux étapes précoces de la synapse entre les homologues. Chez la levure, l'homologue de MutL, Mlh1 est impliqué dans la recombinaison méiotique et agirait après Msh4 et Msh5. Ces trois protéines participeraient à la stabilisation de la jonction de Holliday et sa résolution en enjambement (Hunter et Borts, 1997). Ceci est consistant avec le phénotype des souris Mlh1 négatives où les mâles ont une formation de la synapse normale entre les homologues mais dont le complexe synaptonémal disparaît durant le stade pachytène, provoquant l'apparition de chromosomes univalents (Baker et al., 1996). Les souris femelles Mlh1 négatives, comme les mâles, sont stériles mais leur phénotype méiotique est différent. Elles ovulent d'un nombre normal d'oocytes mais ceux-ci n'excluent pas le second corps polaire, ont une fertilisation réduite et un niveau de division très faible au stade deux cellules (Edelmann et al., 1996) ce qui résultent d'une recombinaison réduite et d'un dérèglement du processus de la méiose (Woods et al., 1999). La défectuosité de Pms2 chez les souris résulte en une infertilité des mâles qui est associée avec une défectuosité de l'appariement durant la synapse (Baker et al., 1995). Les souris *msh2* négatives semblent pour

leur part être normales (deWind et al., 1995). Chez l'humain, des mutations dans plusieurs gènes du système de MMR (MSH2, MSH6, MLH1, PMS1 et PMS2) entraînent une grande susceptibilité au syndrome de Lynch (syndrome de cancer colorectal non-polype, Lynch et de la Chapelle, 1999)

1.2.2.3 Contrôle de la recombinaison homologue par le système de MMR

Chez la bactérie *E. coli*, l'inactivation du système de MMR (MutS ou MutL) provoque une augmentation de 1 000 fois du taux de recombinaison entre les génomes de *E. coli* et *S. typhimurium*, dont la divergence est de 18% (Rayssiguier et al., 1989), par rapport à la recombinaison entre des séquences parfaitement identiques. L'absence d'un système de MMR fonctionnel entraîne aussi une augmentation du taux de recombinaison entre des séquences interchromosomiques ou intrachromosomiques non-identiques (Rayssiguier et al., 1989; Petit et al., 1991) et entre des séquences exogènes introduites par conjugaison, transduction ou transformation (Feinstein et Low, 1986; Matic et al., 1995; Shen et Huang, 1986; Rayssiguier et al., 1989; Zahrt et al., 1994). Ainsi, le système de MMR bactérien contribue à maintenir une barrière génétique entre les espèces et permet de prévenir l'incorporation d'informations génétiques dans le génome de la bactérie. Le système de MMR semble aussi assurer la stabilité du génome bactérien en prévenant les réarrangements par recombinaison homologue entre les séquences d'ADN répétées endogènes qui sont naturellement divergentes (Petit et al., 1991).

Chez la levure, l'effet de prévention de la recombinaison par la mutation de certaines protéines du système de MMR est moins important que chez la bactérie et cette différence pourrait s'expliquer par la redondance qui existe entre les protéines des systèmes de MMR des eucaryotes (revue par Modrich et Lahue, 1996). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une mutation de Msh2, Mlh1 ou Pms1, des homologues fonctionnels des protéines bactériennes MutS et MutL, provoque une augmentation de 10 à 140 fois de la fréquence de recombinaison chromosomique entre des séquences divergentes (Datta et al., 1996, 1997; Nicholson et al., 2000). Cependant, la fréquence de recombinaison extrachromosomique entre des séquences divergentes n'est augmentée que de deux fois lorsque Pms1 ou Msh2 sont inactivées (Alani et al., 1994; Porter et al., 1996).

Chez les mammifères, l'effet du système de MMR est encore mal connu mais une étude semble indiquer que ce système joue aussi un rôle important dans le contrôle de la recombinaison entre les séquences divergentes: une augmentation de 50 fois de la fréquence de recombinaison entre des séquences 0,6% divergentes lors du ciblage de gène (« *gene targeting* ») a été observée suite à l'inactivation du gène MSH2 (deWind et al., 1995).

Ces études ont amené à proposer l'hypothèse que le système de MMR inhibe aussi la recombinaison entre les séquences divergentes chez les mammifères de façon à assurer la stabilité du génome.

1.2.3 CONTRÔLE DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE PAR P53

Le produit du gène suppresseur de tumeur p53 est considéré comme le gardien du génome (Lane et al., 1992) qui régule la réponse cellulaire à toute une variété de signaux de stress et principalement les dommages à l'ADN causés par des facteurs exogènes. Des études montrant la reconnaissance *in vitro* par p53 de structures d'ADN cruciformes (Kim et al., 1997) et de jonctions de Holliday (Lee et al., 1997) ont permis d'attribuer un rôle à p53 dans la recombinaison homologue. Par la suite, il a été montré que p53 inhibe la recombinaison homologue spontanée interplasmidique et intrachromosomique (Bertrand et al., 1997; Dudenhöffer et al., 1998; Honma et al., 1997; Mekeel et al., 1997; Willers et al., 2000) et semble inhiber plus fortement la recombinaison homologue suite à la reconnaissance d'appariement erronés de bases dans les intermédiaires de recombinaison (Dudenhöffer et al., 1998).

Ceci indique que p53 serait impliqué dans la fidélité de la recombinaison et plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'effet « anti-recombinogène » de p53. D'abord, l'interaction directe de la protéine p53 avec le complexe de protéines de recombinaison Rad51 et BRCA2 pourrait inhiber l'activité de recombinaison (Stürzbecher et al., 1996). p53 pourrait aussi dissoudre activement l'intermédiaire de recombinaison contenant des appariements erronés, en provoquant la réversion de la migration des brins (Bakalkin et al., 1994; Brain et Jenkins, 1994; Oberosler et al., 1993) ou en participant directement à l'enlèvement

de l'erreur par son activité exonucléase 3'→5' (Albrechtsen et al., 1999; Janus et al., 1999; Mummenbrauer et al., 1996). Il est aussi possible que la régulation de la recombinaison homologue implique la trans-activation par p53, suite à la reconnaissance des appariements erronés sur les ADN bicaténaire naissants, de gènes comme p21 ou de gènes encore inconnus et susceptibles d'interférer avec la recombinaison homologue (Willers et al., 2000). Cette possibilité que p53 interfère indirectement avec la recombinaison homologue par sa fonction de reconnaissance des appariements erronés pourrait faire un parallèle avec les propriétés anti-recombinogènes du système MutSLH (Fishel et Kolodner, 1995; voir section 1.2.3.4).

1.2.4 RÔLES PARADOXALES DE P53 ET DU SYSTÈME MMR DANS LE MAINTIEN DE LA STABILITÉ GÉNOMIQUE

Les études qui ont mené à proposer que la divergence entre les séquences, le système de MMR et p53 ont des effets inhibiteurs sur la recombinaison homologue, n'ont pas pris en considération que les cassures bicaténares d'ADN nécessitent la recombinaison homologue pour leur réparation. Les cassures bicaténares d'ADN non réparées ou mal réparées par d'autres mécanismes de réparation de l'ADN entraînent aussi l'instabilité génomique. Pour que ces études soient conformes avec le maintien de la stabilité du génome, il faudrait que p53 et le système de MMR aient des effets différents selon que la recombinaison homologue est spontanée ou induite par une cassure bicaténaire d'ADN.

1.3 Objectifs

Les objectifs de cette étude sont de développer un essai de recombinaison homologue non-sélectif afin de (1) déterminer l'effet de la divergence de séquence et du système de MMR sur la recombinaison homologue chez les mammifères. (2) Comparer les effets de la divergence de séquence et du système de MMR des mammifères sur la recombinaison spontanée et la recombinaison induite par des cassures bicaténares d'ADN. Et (3) déterminer avec quelles étapes du processus de recombinaison homologue la divergence de séquence interfère et quel est le rôle du système de MMR des mammifères dans cette interférence.

(1) Plusieurs études ont déjà permis de démontrer que chez les bactéries et les levures, la divergence entre les séquences et le système de MMR diminuent la fréquence de recombinaison homologue. Ces études ont permis de suggérer que ces deux facteurs contribueraient au maintien de la stabilité du génome par leurs effets inhibiteurs sur la recombinaison homologue. Chez les mammifères, la divergence de séquence entraîne une diminution de la fréquence de recombinaison mais un rôle du système de MMR dans cette diminution n'a pas été démontré. Toutefois, la conservation des systèmes de MMR depuis les bactéries jusqu'aux mammifères et une étude récente permettent de supposer que le système de MMR des mammifères contribuerait aussi à contrôler la recombinaison homologue et à maintenir la stabilité du génome. Cette hypothèse ne tient cependant pas compte de l'importance de la recombinaison homologue dans la réparation des cassures bicaténares d'ADN.

(2) Nous utiliserons l'essai de recombinaison homologue non-sélectif pour comparer les effets de la divergence de séquence et du système de MMR sur la recombinaison homologue spontanée et la recombinaison homologue induite par des cassures bicaténares d'ADN. Jusqu'à maintenant aucune étude n'a comparé directement les effets de ces deux facteurs sur la recombinaison spontanée et sur la recombinaison induite par une cassure bicaténaire d'ADN. Cette étude permettra de mieux comprendre quels sont les rôles de la divergence de séquence et du système de MMR dans le maintien de la stabilité du génome.

(3) Notre essai de recombinaison homologue permettra aussi de déterminer quelles étapes du processus de recombinaison homologue sont affectées par la divergence de séquence et par le système de MMR chez les mammifères. Les essais de recombinaison utilisés jusqu'à ce jour dans les cellules de mammifères ne permettent pas de déterminer si la divergence de séquence provoque une diminution de la fréquence de recombinaison en diminuant l'efficacité de l'initiation de la recombinaison, ce qui empêche les séquences de se recombiner, ou en interférant avec une étape plus tardive de la recombinaison comme la formation ou la résolution des intermédiaires de recombinaison. Dans ce cas, la formation d'événements de recombinaison de type imprécis serait favorisé mais les essais sélectifs de recombinaison ne permettent pas leur détection.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 CONSTRUCTION DE VECTEURS

Tous les vecteurs ont été construits en utilisant les techniques classiques de biologie moléculaire (Current protocol in molecular biology, sections 3.1, 3.5, 3.10 et 3.14) et en suivant les recommandations des fournisseurs d'enzymes pour les digestions enzymatiques (NEB, Pharmacia, Boehringer-Mannheim, Gibco-BRL), la déphosphorylation par la phosphatase CIP (NEB), la génération d'extrémités franches à partir d'extrémités 5' ou 3' récessives avec la T4 DNA polymérase (NEB) et le fragment Klenow de la DNA polymérase I de *Escherichia coli* (NEB) respectivement, et l'union par la T4 DNA ligase (NEB). La récupération des fragments d'ADN provenant de digestion enzymatique a été faite par électroélution à partir de gels de 0,7% ou 1% d'agarose. L'électroélution des fragments d'ADN a été faite par excision de la bande d'agarose et centrifugation sur laine de silicone suivie d'une précipitation à l'éthanol 95% et d'un rinçage à l'éthanol 70% pour éliminer les sels de l'ADN. L'ADN a par la suite été dissous dans l'eau.

Après traitement à la ligase, l'ADN a été introduit dans des bactéries électrocompétentes *Escherichia coli* d'une souche « *sure cells* » ou « *DH5 α* », qui sont déficientes pour la recombinaison homologue, par électroporation à 2500 V, 200 Ω et 21 μ F, dans des cuvettes à électroporation de 0,2 cm. Les bactéries ont

par la suite été diluées dans 1 ml de milieu sans ampicilline et incubées avec agitation pendant une heure à 37 °C. Après incubation, les bactéries ont été étalées sur des géloses solides de Luria Broth contenant 0,7% d'agar et 50 µg/ml d'ampicilline (Wisent) puis incubées toute la nuit à 37 °C.

Des colonies de bactéries ont par la suite été repiquées séparément dans du milieu Luria Broth et amplifiées durant environ 15 heures à 37 °C avec agitation. L'ADN des colonies a été extrait par lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979; Birnboim, 1983). L'ADN obtenu a été analysé par digestion enzymatique et visualisé sur un gel de 0,7% d'agarose.

L'ADN des vecteurs finaux, utilisé pour transférer les cellules de mammifères a été préparé et purifié avec un kit d'extraction et selon les recommandations du fabricant (Qiagen).

2.1.1 CONSTRUCTION DE PJF2

Le plasmide pJF2 (Figure 10, page 75) comporte deux fragments identiques provenant de la séquence LINE de souris L1Md-A2 comme substrats de recombinaison. Les deux fragments L1Md-A2 de 2740 pb (position 4179 à 6919, Loeb et al., 1986) ont été introduits dans les sites SmaI (position 412) et HincII (position 429) de pUC19 (NEB), en orientation inverse et divergente. La séquence

promotrice de l'ARN polymérase II de souris, Pol2S (Soriano et al., 1991), a été ajoutée dans le site HindIII (position 5501) du fragment LINE du site SmaI de pUC19. Le gène HSV-*tk*, un fragment PvuII de 2,0 kpb provenant du plasmide pAGO (Colbere-Garapin et al., 1979), a été inséré dans le site XbaI (423) de pUC19, entre les deux fragments LINE. Le gène néomycine, dépourvu de son promoteur et précédé du site d'initiation interne de la traduction du virus de l'encéphalomyocardite, Néo Δ Pr, provenant du vecteur pL1Zin (Ghattas et al., 1991), a été introduit en aval des deux fragments LINE, dans le site HindIII (position 447).

2.1.2 CONSTRUCTION DE PBV100

Le plasmide pBV100 (Figure 19, page 96) comporte deux fragments de recombinaison identiques de 2740 pb provenant du LINE de souris L1Md-A2 (position 4179 à 6919, Loeb et al., 1989), qui sont placés en orientation inverse et divergente dans les sites SmaI et HincII de pUC19 (NEB). Le fragment LINE qui est cloné dans le site HincII comporte la séquence de 236 pb du promoteur de l'ARN polymérase II de souris Pol2S (Soriano et al., 1991), dans son site HindIII (5501). Les marqueurs de sélection HSV-*tk* (fragment PvuII du vecteur pAGO, Colbere-Garapin et al., 1979) et néomycine (pSG1Néo; Southern et Berg, 1982) qui sont dépourvus de leur promoteur respectif et précédés d'un site d'initiation interne de la traduction provenant respectivement des virus de la poliomyélite (pP2-5') et

de l'encéphalomyocardite (pCITE, Novagen), forment une unité biscistronique qui est insérée dans le site XbaI (position 423) de pUC19 situé entre les deux fragments LINE.

2.1.3 CONSTRUCTION DE PL1DIR100

Le plasmide pL1dir100 (Figure 21, page 101) comporte deux fragments LINE de souris L1Md-A2 (4179-6919, Loeb et al., 1989) identiques qui ont été clonés en orientation directe dans les sites SmaI (position 412) et HincII (position 429) de pUC19 (NEB) de part et d'autre des gènes HSV-*tk* (fragment PvuII de 2,0 kpb du plasmide pAGO; Colbere-Garapin et al., 1979) et néomycine (AvaI, position 452, à HindIII, position 1609 de pSG1néo) qui sont en orientation inverse et divergente l'un par rapport à l'autre. Le gène de sélection puromycine (EcoRI, position 30, à NotI, position 1740 de pGKpuro) a été introduit dans le site NdeI provenant du vecteur pUC19 dans le plasmide pL1dir100, dans la même orientation que le gène HSV-*tk* pour former le plasmide pL1dirP100.

2.1.4 CONSTRUCTION DE PST100 ET PST85

Les plasmides pST100 et pST85 (Figure 23, page 106) qui comportent respectivement les séquences de recombinaison LINE 100% et 85% homologues ont été construits à partir du plasmide pMC1neopA qui contient le marqueur de sélection néomycine dans un vecteur pUC19 (Stratagene). Le plasmide

pMC1neoInt a été généré en introduisant un intron synthétique de 59 pb contenant le site de restriction NotI, dans le site PvuII qui est unique dans la région codante du gène néomycine de pMC1neopA. La séquence de l'intron synthétique qui sépare maintenant le gène néomycine en deux exons, est dérivée de la séquence consensus des introns de type II (Genes V, chapitre 31) et de la séquence de l'intron I de la β -globine humaine (Lawin et al., 1980) et comprend les éléments de base qui sont essentiels pour son épissage: un site donneur 5' (GT), un site accepteur 3' (AG) et un site d'embranchement (CACTGAC). L'exon 5' du gène néomycine (néo5', fragment XhoI-NotI de pMC1neopAInt) fut inséré dans le site unique Sall de l'élément LINE de souris, L1Md-A2 dans les vecteurs pL1-100 et pL1-85 pour générer les vecteurs pL1-100néo5' et pL1-85néo5' respectivement. pL1-100 contient deux fragments internes de 2,2 kpb de L1Md-A2 en position inversée et fut construit en deux étapes: d'abord le fragment HincII (4211)-BamHI (6358) de L1Md-A2 (Loeb et al., 1989) avec un linker Sall dans le site HindIII (5501) a été cloné dans le site HincII-BamHI de pUC19 pour générer le plasmide pUCL1Md. Ensuite, un fragment L1Md-A2 identique mais avec un linker XhoI plutôt que Sall dans le site HindIII (5501) a été cloné dans le site SmaI-BamHI de pUCL1Md en orientation inverse pour créer pL1-100. Pour construire pL1-85, le fragment interne de 2,0 kpb, SspI (3995)-BamHI (6029) du LINE de rat L1Rn3 (D'Ambrosio et al., 1986) a été introduit dans le site SmaI-BamHI de pUCL1Md en orientation inverse à celle du fragment L1Md-A2. L'exon 3' du gène néomycine (néo3') (NotI-BamHI) de pMC1neoInt a été inséré dans le site BamHI, entre les deux fragments

LINE inversés, dans pL1-100 et pL1-85 pour générer pL1-100néo et pL1-85néo. Dans le site XhoI (5501) de L1Md-A2 et le site MscI (4968) de L1Rn3 des plasmides pL1-100néo et pL1-85néo respectivement, nous avons introduit le site de reconnaissance de la méganucléase I-SceI pour générer les plasmides finaux pST100 et pST85.

2.2 CULTURE DE CELLULES

Les lignées cellulaires HeLa, LMTK, SW480, HCT116 et SKUT-1 provenant toutes de l'ATCC, ont été respectivement maintenues dans les milieux DMEM (HeLa et LMTK), Leibovitz's 15, McCoy's et MEM (Wisent). Tous les milieux de culture ont été additionnés de 10% de sérum de veau fœtal (Wisent), 50 µg/ml de gentamicine (Wisent) et de 250 µg/ml d'amphotéricine B (fongizone, Gibco-BRL), un agent antifongique. Toutes les cellules ont été maintenues à 37 °C, dans une atmosphère humide à 5% de CO₂, sauf pour les SW480 qui ont été amplifiées dans une atmosphère sans CO₂. Les cellules ont été passées à tous les 3 ou 4 jours.

2.3 TRANSFECTION DE CELLULES

2.3.1 ÉLECTROPORATION

Des cellules ayant environ 80% de confluence sont trypsinisées, rincées au PBS puis diluées à une densité de $3,75 \times 10^6$ cellules par ml dans du milieu ne contenant ni sérum, ni antibiotique, à température ambiante. Les électroporations ont été faites avec un volume de 0,8 ml de suspension de cellules (3×10^6 cellules) et l'ADN dans des cuvettes de 0,4 cm, avec un électroporateur BioRad réglé à 250 V et 950 μ F. Suite à l'électroporation, les cellules ont été gardées à température ambiante pendant 10 minutes avant d'êtreensemencées dans du milieu complet avec sérum et antibiotiques.

Les conditions d'électroporation ont préalablement été déterminées pour chacune des lignées cellulaires utilisées. La température d'incubation post-électroporation ainsi que le voltage ont été optimisés. Les cellules, au nombre de 3×10^6 , ont été électroporées à des voltages variant de 100 à 400 V inclusivement avec des augmentations par tranches de 50 V. L'expérience a été faite en triplicata avec 10 μ g du vecteur contrôle pGKpuro. Après l'électroporation, les cellules ont été incubé à la température ambiante ou à 4 °C pendant 10 minutes avant d'êtreensemencées dans du milieu complet à 37 °C, contenant sérum et antibiotiques. Deux jours plus tard, la sélection puromycine a été ajoutée aux cellules et les

colonies résistantes ont été fixées et colorées, après une semaine de sélection, avec une solution de 3% formaldéhyde, 4% acide acétique, 1% crystal violet dans l'éthanol 70%. Toutes les colonies d'environ 50 cellules et plus ont été comptées.

2.3.2 AGENTS DE SÉLECTION:

Les cellules transfectées ont été soumises aux agents de sélection 48 heures après la transfection, afin de permettre d'isoler seulement les cellules qui ont incorporé l'ADN transfecté ou les cellules dans lesquelles un événement de recombinaison extrachromosomique s'est produit.

Pour les cellules LMTK nous avons utilisé la sélection HAT: 100 μ M d'hypoxantine, 0,4 μ M d'aminoptérine et 16 μ M de thymidine et la sélection GAF: 5,4 μ M de ganciclovir, 88,8 μ M d'acyclovir et 0,5 μ M de FIAU (Brisebois et Dubow, 1993; Zheng et Wilson, 1990)

La concentration optimale des différentes autres drogues qui est nécessaire pour éliminer les cellules n'exprimant pas le gène de sélection sans être toxique pour les cellules l'exprimant a été déterminée pour chaque lignée cellulaire utilisée. Un million de cellules non-transfectées ont étéensemencées en triplicata dans des boîtes de pétri (60 à 80% de confluence), et soumises à des concentrations croissantes d'agents de sélection. Les concentrations d'agents de sélection utilisées varient de

100 à 1000 $\mu\text{g/ml}$ pour le G418 (Gibco-BRL) et l'hygromycine (Boehringer-Mannheim) avec des augmentations par tranches de 100 $\mu\text{g/ml}$ et de 1 à 5 $\mu\text{g/ml}$ pour la puromycine (Sigma) avec des augmentations par tranches de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. La concentration optimale qui a été retenue pour être utilisée par la suite avec les cellules transfectées, correspond à la concentration immédiatement au-dessus de celle qui permet d'éliminer toutes les cellules normales (Tableau I).

Tableau I: Conditions de sélection pour chaque lignée cellulaire

Cellules	Agents de sélection ($\mu\text{g/ml}$)		
	G418	Hygromycine	Puromycine
Hela	700	350	1
LMTK	400	250	7
SW480	800	750	3
HCT116	500	200	1,5
SKUT-1	600	200	0,5

2.4 EXTRACTION D'ADN GÉNOMIQUE

L'extraction de l'ADN génomique des cellules a été faite selon la méthode de « *salting out* » (Current protocols in molecular biology, section 2.2). Les cellules d'une boîte de pétri de 100 mm à environ 80% de confluence, ont été préalablement rincées avec du PBS puis incubées pendant 10 minutes avec 3 ml de solution de lyse (1 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM NaCl, 10% Sarkosyl et 10 mg/ml protéinase K (Gibco-BRL). Ensuite les cellules ont été transférées dans un tube et incubées à 56 °C pendant 2 heures. L'ADN a été purifié par une extraction au phénol-chloroforme, puis précipité avec 8 ml d'éthanol 95% et récupéré à l'aide d'une tige de verre. Les sels présents dans l'ADN ont été éliminés par un rinçage à l'éthanol 70%. L'ADN séché à l'air a été dissous dans 100 µl de TE (1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM Tris-HCl pH7,6) contenant 300 ng/ml de RNase A (Boehringer Mannheim).

2.5 ÉTABLISSEMENT DE CLONES CELLULAIRES PARENTAUX

Suite à la transfection des plasmides dans les cellules pour les essais de recombinaison intrachromosomique, des clones cellulaires parentaux ont été établis en analysant l'intégration du plasmide qui doit être intacte et unique. Ceci a été fait en analysant l'ADN génomique des clones par la technique de Southern. Dix µg d'ADN génomique ont été digérés avec une enzyme qui reconnaît un site de

restriction unique dans le vecteur. L'ADN digéré a ensuite été migré sur un gel d'agarose 1%, dénaturé dans une solution de 0,4 M NaOH/1,5 M NaCl, transféré sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond N+, Amersham) puis fixé à la membrane par exposition aux rayons ultra-violet. La membrane a par la suite été incubée pendant trois heures à 68 °C avec la solution d'hybridation (4,5 X SSC, 7,6 % formamide, 1,5 mM EDTA, 0,8 % lait écrémé, 8% sulfate dextran, 0,8 % SDS, 10 mg ADN de sperme de saumon). Ensuite une sonde marquée au ³²P a été ajoutée à la solution d'hybridation, puis incubée toute la nuit à 68 °C. Après des lavages avec des solutions de 1X SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium) et 0,3X SSC (45 mM NaCl, 4,5mM citrate de sodium) contenant 1% de SDS, la membrane a été exposée à un film pour autoradiogramme.

2.6 ANALYSE DES RECOMBINANTS OBTENUS AVEC LES PLASMIDES PST100 ET PST185

Les événements de recombinaison ont été analysés par PCR en utilisant les amorces néo952⁺ (5'-ccacgacggcgcttccttgccgag-3') et néo1300⁻ (5'-gtcacgacgagatcctcgccgtc-3') (la position des amorces est illustrée à la figure 27, page 121) qui permettent d'amplifier un fragment de 1,3 kpb, caractéristique d'un événement de recombinaison et dans certains cas de conversion génique, un fragment supplémentaire de 2,2 kpb. La réaction de PCR a été effectuée sur 400 ng d'ADN génomique extrait selon la procédure décrite à la section 2.4. Pour certaines analyses de recombinants, l'ADN génomique a été extrait directement d'une colonie de cellule selon une adaptation du protocole habituel. Dans ces cas,

la totalité de l'ADN extrait a été utilisé pour effectuer la réaction de PCR. A l'ADN est ajouté, 200 μ M dNTP, 2,5% DMSO, 15 mM $MgCl_2$, 100 ng de chaque amorce, le tampon commercial et 1,75 unités de polymérase du kit Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim). Le mélange de polymérase est ajouté à la réaction après 2 minutes de dénaturation à 94 °C (« *Hotstart* »), afin de prévenir l'amplification non-spécifique de fragments d'ADN. La réaction de PCR comporte 30 cycles d'amplification incluant une étape de dénaturation de 15 secondes à 94 °C suivie d'une étape d'appariement et de synthèse à 71 °C d'une durée de 2 minutes pour les 10 premiers cycles et de 20 secondes supplémentaires par cycle pour les 20 cycles suivants. Une période de synthèse d'ADN de 6 minutes à 72 °C permet de finaliser les réactions amorcées. Les produits de PCR sont par la suite analysés sur un gel de 0,7% d'agarose et par hybridation avec la technique de Southern.

2.7 EXTRACTION DE PROTÉINES

Les protéines ont été extraites selon le protocole de Sambrook, Fritsh et Maniatis (chapitre 18) en diluant directement les cellules dans le tampon de chargement qui contient du SDS pour la lyse cellulaire.

2.8 TECHNIQUE DE TRANSFERT DE WESTERN

Les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide de 8% puis transférées par électrotransfert, sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) selon le protocole de Sambrook, Fritsh et Manniatis (chapitre 18). Ensuite les protéines Msh2 (100 kDa) et Mlh1 (83 kDa) ont été détectées par chemiluminescence avec des anticorps polyclonaux (Calbiochem) et la peroxidase (Amersham).

2.9 ANALYSE FONCTIONNELLE DU SYSTÈME DE RÉPARATION DES APPARIEMENTS ERRONÉS DE BASES

2.9.1 RÉSISTANCE AU MNNG

La résistance des cellules au MNNG a été déterminée selon le protocole de Koi et al. (1994). Des cellules en croissance exponentielle, au nombre de 10^5 , ont été diluées dans un ml de milieu sans sérum puis traitées pendant 45 minutes avec des concentrations de 0; 1,25; 2,5 et 5 μ M de MNNG à 37 °C. Ensuite les cellules ont été rincées avec du milieu sans sérum puisensemencées en duplicata à 1, 10, 10^2 , 10^3 et 10^4 cellules par puit d'une plaque de 24 puits. Dix jours plus tard, les clones ont été fixés et colorés et le taux de survie pour chacune des concentrations de MNNG utilisées fut calculé en comptant le nombre de colonies d'environ 50 cellules et plus.

2.9.2 FRÉQUENCE DE MUTATION DU GÈNE HPRT

Les cellules qui ont d'abord été traitées avec la sélection HAT pendant 10 jours, pour éliminer les cellules qui auraient une mutation de leur gène HPRT, ont été ensemencées en triplicata à 5×10^5 cellules par pétri de 100 mm avec du milieu contenant 5 $\mu\text{g/ml}$ de 6-thioguanine (Bhattacharyya et al., 1994). Les colonies survivantes ont été colorées et comptées 14 jours plus tard et la fréquence de mutation du gène HPRT a été calculée.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 MISE AU POINT D'UN ESSAI DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE NON-SÉLECTIF

Chez les mammifères, plusieurs essais de recombinaison homologue ont déjà été développés et ont permis d'obtenir une grande quantité d'information concernant les facteurs qui affectent la recombinaison homologue (revue par Bollag et al., 1989). Étant donné que ces essais de recombinaison sont sélectifs, c'est-à-dire qu'ils utilisent comme substrats de recombinaison des marqueurs de sélection, ils s'avèrent être limités par les niveaux de divergence disponibles entre les séquences et par les événements qu'ils détectent. Nos études précédentes ont montré que la recombinaison entre des séquences divergentes peut mener à la formation de recombinants imprécis (Belmaaza et al., 1994; Villemure et al., 1997), c'est à dire dont les séquences de départ ne sont pas reconstituées exactement, mais ceux-ci échappent à la détection avec les essais sélectifs qui ne peuvent détecter que les événements de recombinaison qui reconstituent précisément le gène de sélection pour qu'il génère son produit fonctionnel.

Ces limites des essais de recombinaison sélectifs font en sorte qu'ils ne permettent pas d'étudier l'effet de la divergence de séquence et du système de MMR sur la recombinaison homologue et de discriminer entre un effet sur les étapes d'initiation ou de maturation des intermédiaires de recombinaison. Alors, pour échapper aux contraintes des essais déjà existants et effectuer ces études, nous

avons travaillé au développement d'un nouvel essai qui permettrait de récupérer tous les événements de recombinaison, même si les séquences de départ ne sont pas précisément reconstituées. Nous avons d'abord travaillé sur trois stratégies différentes qui n'ont pas donné les résultats escomptés avant de mettre au point l'essai de recombinaison basé sur la reconstitution d'un intron qui a permis de faire l'étude (Voir sections 3.1.4).

Toutes les stratégies utilisées se basent sur la recombinaison entre des séquences d'éléments répétitifs LINE dont le potentiel de recombinaison a déjà été démontré (Belmaaza et al., 1990; 1994; Villemure et al., 1997). Les séquences LINE qui sont utilisées comme substrats de recombinaison, sont des éléments répétitifs présents à plus de 100 000 copies par génome haploïde chez les mammifères et qui ont l'avantage de présenter une légère divergence entre eux lorsqu'ils proviennent d'une même espèce alors que les éléments provenant d'espèces différentes ont un niveau de divergence plus élevé (Hutchison et al., 1989). Les séquences LINE offrent donc la possibilité d'utiliser des substrats de recombinaison avec des niveaux de divergence variés. Dans les cas où la recombinaison implique la reconstitution d'un marqueur de sélection, même si la recombinaison entraîne une altération des séquences de recombinaison LINE, les séquences codantes du marqueur de sélection resteront intactes et son expression ne devrait pas en être affectée. C'est pourquoi nous désignons nos essais comme étant non-sélectifs même s'ils nécessitent la reconstitution d'un marqueur de sélection pour isoler les événements de recombinaison.

3.1.1 ESSAI DE RECOMBINAISON BASÉ SUR L'ACQUISITION D'UNE SÉQUENCE PROMOTRICE

Nous avons d'abord mis au point un essai de recombinaison homologue permettant de déterminer l'effet de la divergence de séquence sur la recombinaison homologue (Figure 10 et 11). Cet essai consiste à faire recombiner deux séquences LINE de façon à aligner la séquence promotrice courte (short: S) de l'ARN polymérase II (Pol2S) de souris (Soriano et al., 1991) avec la séquence codante du marqueur de sélection néomycine qui est dépourvu de son propre promoteur, $\text{néo}\Delta\text{Pr}$ (Ghattas et al., 1991). Les deux fragments identiques de 2740 pb provenant de la séquence LINE de souris L1Md-A2 (position 4179 à 6919; Loeb et al., 1989) qui sont utilisés comme substrats de recombinaison, sont placés en orientation inverse et divergente en amont du marqueur de sélection inactif $\text{néo}\Delta\text{Pr}$. Les deux séquences de recombinaison flanquent un marqueur de sélection actif, le gène de la thymidine kinase (HSV-*tk*) provenant du plasmide pAGO (Colbere-Garapin et al., 1979). La séquence promotrice Pol2S est située au centre de la séquence LINE la plus éloignée du gène néomycine, en orientation inverse par rapport à ce dernier de sorte qu'elle ne permet pas l'expression du gène néomycine (Figure 10). C'est la recombinaison homologue entre les deux séquences LINE, par conversion génique, conversion génique associée à un enjambement, enjambement ou double enjambement, qui entraînera l'acquisition du promoteur Pol2S par la séquence LINE située immédiatement en amont du gène néomycine pour permettre son expression qui servira à sélectionner les événements de recombinaison (Figure 11).

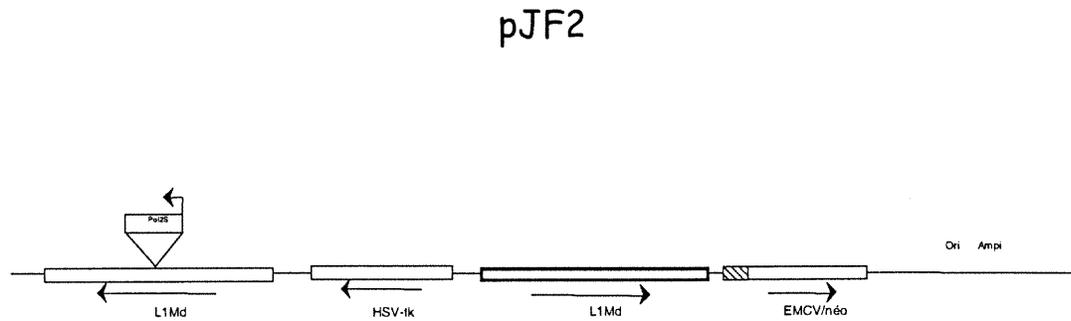


Figure 10:

Un essai de recombinaison basé sur l'acquisition d'une séquence promotrice. Les flèches indiquent l'orientation 5'-3' des fragments d'éléments LINE, du promoteur Pol2S et des marqueurs de sélection HSV-tk et néomycine (néo). La boîte hachurée représente la séquence du site d'initiation interne de la traduction provenant du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV).

Colonies pJF2 résistantes à la sélection G418

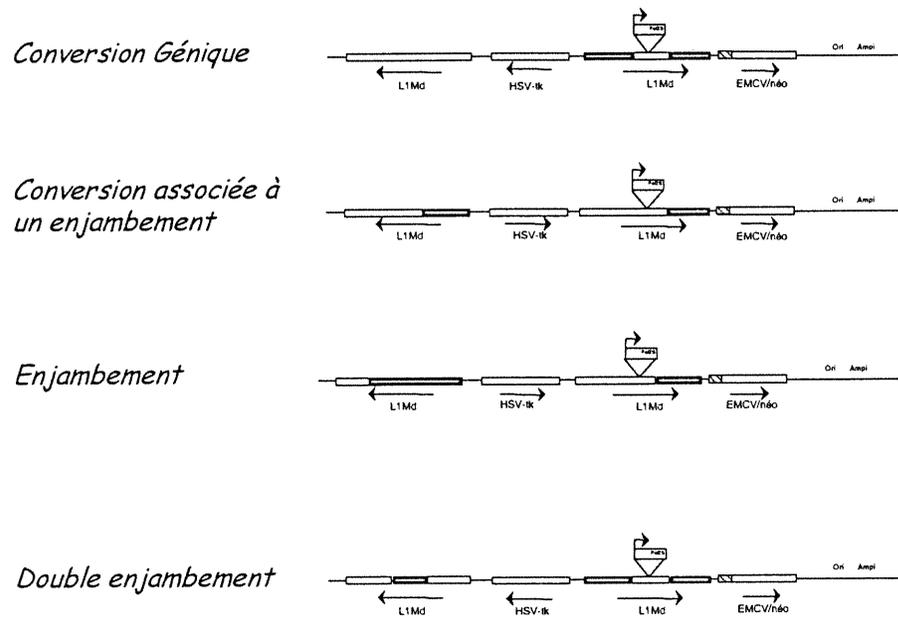


Figure 11:

Représentation schématique des événements de recombinaison pouvant reconstituer un gène néomycine fonctionnel en alignant la séquence promotrice Pol2S avec le gène néomycine. L'essai pJF2 permet de discriminer entre les événements de conversion génique, conversion associée à un enjambement, enjambement et double enjambement.

La présence d'un site d'initiation interne de la traduction, provenant du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV; Ghattas et al., 1991) est placé juste en amont du gène néomycine, afin que la traduction de l'ARN messenger respecte le cadre de lecture permettant de produire la protéine néomycine fonctionnelle.

Dans un premier temps, la capacité du promoteur Pol2S à activer l'expression du gène néomycine dépourvu de son propre promoteur a été testée. A cette fin, le vecteur pJF2Flip (Figure 12) a été construit en inversant la portion d'ADN du vecteur pJF2 qui comprend le marqueur HSV-*tk* et les deux fragments LINE le flanquant, de sorte que le promoteur Pol2S et le gène néomycine sont correctement alignés pour permettre l'expression de ce dernier. Le plasmide pJF2Flip a été introduit dans les cellules de souris LMTK et son intégration a été sélectionnée à l'aide du gène de sélection HSV-*tk* porté par le vecteur. Le gène de sélection HSV-*tk* permet aux cellules LMTK, qui n'expriment pas leur thymidine kinase endogène, de croître dans du milieu contenant l'agent de sélection HAT. Seize clones pJF2Flip, HAT résistants ont été isolés puis soumis à la sélection G418 qui ne permet qu'aux cellules qui expriment le gène néomycine de survivre. Malgré la position du promoteur qui permet l'expression du gène néomycine dans le plasmide pJF2Flip, aucun des 16 clones HAT résistants testés n'a survécu à la sélection G418. L'absence d'expression du gène néomycine pourrait résulter de la déféctuosité d'une ou plusieurs des composantes du gène, que ce soit le promoteur Pol2S, le site d'initiation interne de la traduction EMCV et/ou les séquences codantes du gène néomycine. Pour vérifier l'exactitude de ces résultats, nous avons

pJF2Flip

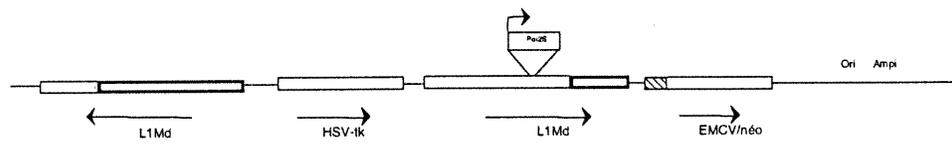


Figure 12:

Le plasmide pJF2Flip représente une reconstitution d'un événement d'enjambement à partir du plasmide pJF2.

à nouveau transfecté les cellules LMTK avec le plasmide pJF2Flip. Cette fois, les cellules ont été divisées en trois populations similaires deux jours après la transfection, donc après environ deux divisions cellulaires, puis ont été soumises à différents agents de sélections, soit HAT, G418 ou HAT + G418. L'obtention de colonies cellulaires résistantes aux sélections G418 et HAT + G418 (Tableau II, page 80), nous indique qu'aucune des composantes du gène néomycine n'est défectueuse puisque le gène néomycine doit être exprimé pour permettre aux cellules de résister à la sélection G418. Cependant, la différence entre le nombre de colonies résistantes à la sélection HAT (69 colonies) et à la sélection G418 (29 colonies), indique que dans certains cas, même si les deux gènes de sélection, HSV-*tk* et néomycine, sont fonctionnels, un seul des deux gènes est exprimé. Et ceci semble être confirmé par le très faible nombre de colonies qui expriment les deux marqueurs en même temps pour résister à la fois à la sélection HAT et à la sélection G418 (7 colonies; Tableau II). Cette différence de niveau d'expression des deux marqueurs de sélection portés par le vecteur pJF2Flip, pourraient résulter d'un effet d'interférence transcriptionnelle. L'interférence transcriptionnelle est l'effet de la transcription d'un gène sur la transcription d'un autre gène situé à proximité (Cullen et al., 1984; Emerman et Temin, 1984, 1986a, 1986; Proudfoot, 1986; Hirschman et al., 1988). Selon l'orientation relative des promoteurs des deux gènes, cet effet sera positif ou négatif. Ainsi, les promoteurs qui sont placés en orientation divergente (dos à dos) ont une transcription stimulée (Dunaway et Olander, 1993) alors que la transcription des gènes dont les promoteurs sont en orientation directe est réprimée (Cullen et al., 1984; Emerman et Temin, 1984; 1986a; 1986).

Tableau II: Interférence transcriptionnelle entre les gènes HSV-*tk* et néomycine du plasmide pJF2 dans les cellules LMTK

Transfections	Nombre de clones cellulaires		
	HAT ^r	G418 ^r	HAT ^r + G418 ^r
I	47	18	6
II	22	11	1
TOTAL	69	29	7

Pour vérifier si la différence d'expression de nos deux marqueurs de sélection, HSV-*tk* et néomycine, résulte de l'interférence transcriptionnelle, nous avons comparé l'expression du gène HSV-*tk* provenant des plasmides pAGO, qui contient seulement le gène HSV-*tk*, pJF1 (qui diffère de pJF2 seulement par l'absence du promoteur Pol2S), pJF2 et pJF2Flip qui est une reconstitution d'un événement d'enjambement avec pJF2 (Figure 13). Ces plasmides ont été introduits en parallèle dans les cellules LMTK en cotransfection avec un plasmide contrôle, pGKpuro, qui permet d'éliminer les variations d'efficacité de transfection. L'expression du gène HSV-*tk* s'est avérée être similaire avec les vecteurs pAGO et pJF1 où il n'y a aucun autre promoteur à proximité. Par contre avec les plasmides pJF2 et pJF2Flip où le promoteur Pol2S est situé à proximité de HSV-*tk* et dans la même orientation, l'expression du gène HSV-*tk* est diminuée et ne représente plus que 10% de l'expression qui est observée en absence d'un autre promoteur (pAGO

Expression relative de HSV- tk

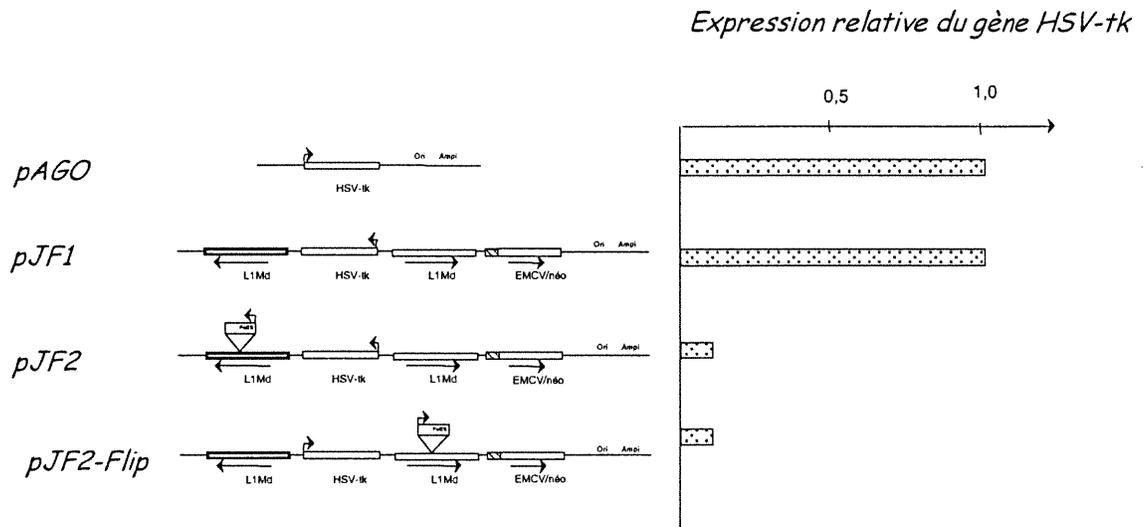


Figure 13:

Chaque construction illustrée a été co-transfectée avec le plasmide contrôle pGKpuro dans les cellules LMtk. L'expression du gène HSV-tk a été normalisée et exprimée relativement à l'expression de HSV-tk du plasmide de référence pAGO (pBR322 contenant le gène HSV-tk).

et pJF1). Ces résultats nous indiquent que la proximité de deux promoteurs affecte l'expression des gènes probablement en interférant avec leur transcription. Puisqu'avec le plasmide pJF2Flip qui est une reconstitution d'un événement d'enjambement, l'ajout de la sélection G418 appliquée après la sélection HAT, ne permet pas de récupérer les cellules dans lesquelles cet événement s'est produit, on pourrait s'attendre à ce que l'utilisation de cette stratégie de sélection avec l'essai de recombinaison pJF2 ne permette pas de récupérer les événements de recombinaison qui alignent le promoteur Pol2S et le gène néomycine Néo Δ Pr. Cependant, avec pJF2, contrairement à pJF2Flip où le gène néomycine est déjà reconstitué, les recombinants seront formés durant l'étape d'amplification des cellules, qui se fait en absence de la sélection HAT qui aura servi à isoler les cellules ayant intégré le vecteur. Ce n'est qu'après la recombinaison homologue que la sélection G418 sera ajoutée aux cellules. Il est donc possible que le changement de conformation qui se produit durant la recombinaison, en absence de sélection HAT, permette au promoteur Pol2S d'échapper aux effets de l'interférence transcriptionnelle. Ceci permettrait l'expression du gène néomycine qui est nécessaire pour isoler les événements de recombinaison. Nous avons établi des clones cellulaires parentaux (voir matériels et méthodes, section 2.5) avec le plasmide pJF2 dans les cellules LMTK. Dans un premier temps, nous avons analysé l'ADN génomique des clones résistants à la sélection HAT qui ont intégré le plasmide pJF2, afin de vérifier l'intégrité de pJF2 (Figure 14). Nous avons ensuite déterminé par Southern le nombre de site d'intégration de pJF2 dans les clones

Intégrité de pJF2

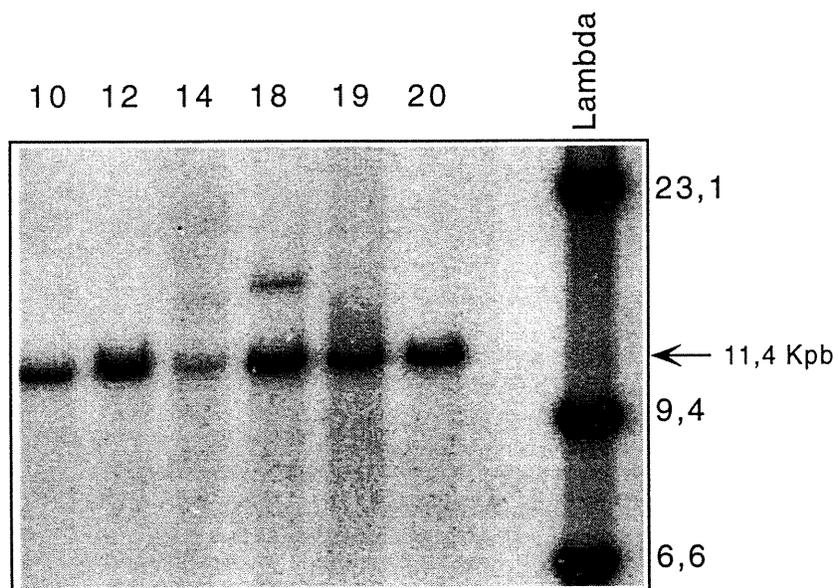
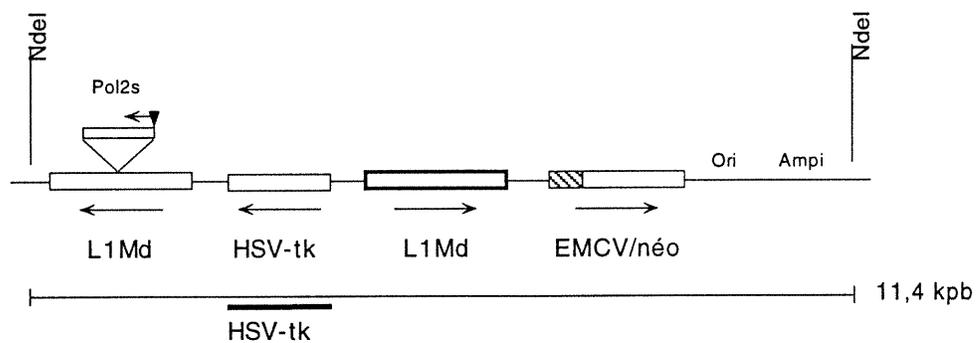


Figure 14: (Légende page suivante)

Figure 14 : Intégrité de pJF2

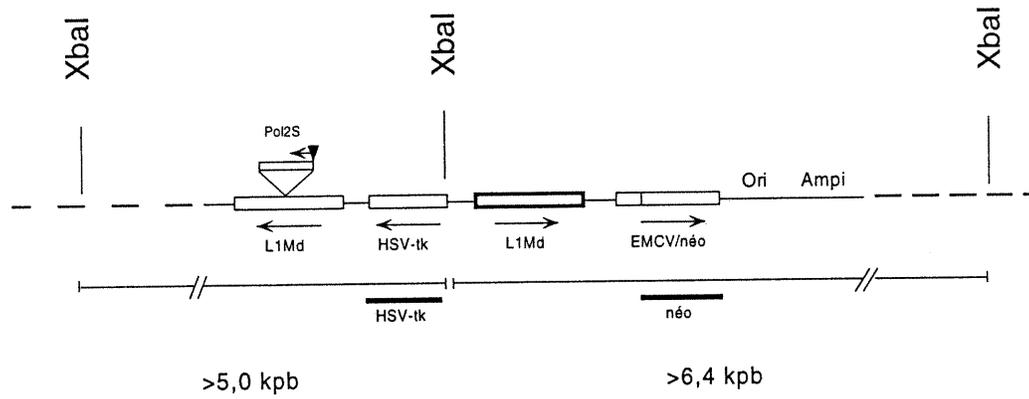
Analyse par Southern de l'intégrité du plasmide pJF2 intégré dans le génome de différents clones LMTK résistants à la sélection HAT. Les sites de restriction de l'enzyme NdeI, utilisée pour digérer l'ADN génomique, sont indiqués sur la représentation schématique. Le trait fin représente le fragment de 11,4 kpb généré par la digestion et le trait large représente le fragment d'ADN HSV-tk utilisé comme sonde. L'ADN du phage λ , digéré par HindIII et marqué radioactivement, est utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

résistants à la sélection HAT (Figure 15). Ceci nous a permis de sélectionner deux clones dont le plasmide pJF2 est intégré en une seule copie intacte, soit les clones LMTK/pJF2 numéro 10 et 14 qui ont par la suite été amplifiés en absence de sélection HAT pour permettre à la recombinaison homologe de se produire. Ensuite, la sélection G418 a été ajoutée pour isoler les cellules résistantes à la sélection G418.

La fréquence de colonies résistantes à la sélection G418 a été déterminée pour chaque clone parental par un test de fluctuation (Capizzi et Jameson, 1973; Luria et Delbrück, 1943). Le taux calculé de colonies résistantes à la sélection G418, $1,5 \times 10^{-6}$ et $3,8 \times 10^{-6}$ événement par locus, par génération cellulaire, pour les clones numéro 10 et 14 respectivement, sont similaires au taux de recombinaison homologe intrachromosomique généralement rapporté dans la littérature et qui est de l'ordre de 10^{-6} événement de recombinaison par locus, par génération cellulaire (Revue par Bollag et al., 1989).

Pour déterminer si les colonies résistantes à la sélection G418 représentent des événements de recombinaison, la structure du plasmide pJF2 dans ces colonies a été déterminée par la technique de Southern (Figure 16). Plusieurs des colonies analysées ont une bande d'ADN caractéristique d'un clone parental (5,0 kpb) alors que les autres ont toutes une bande d'ADN caractéristique d'un événement d'enjambement (6,7 kpb). En plus de ces bandes, toutes les colonies résistantes à la

Nombre d'intégrations de pJF2



Jonctions HSV-tk

Jonctions néo

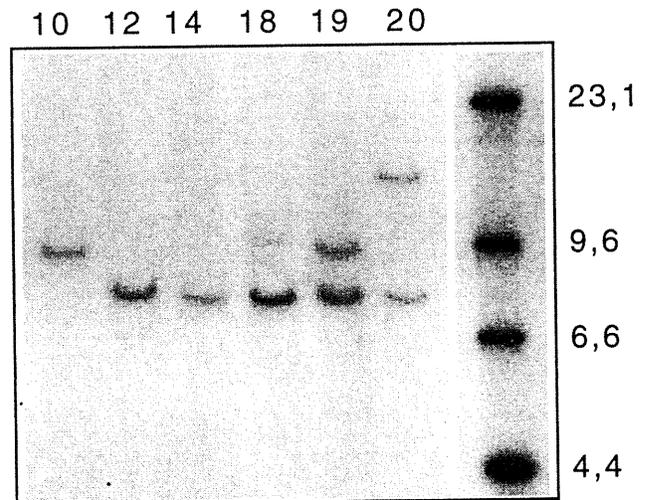
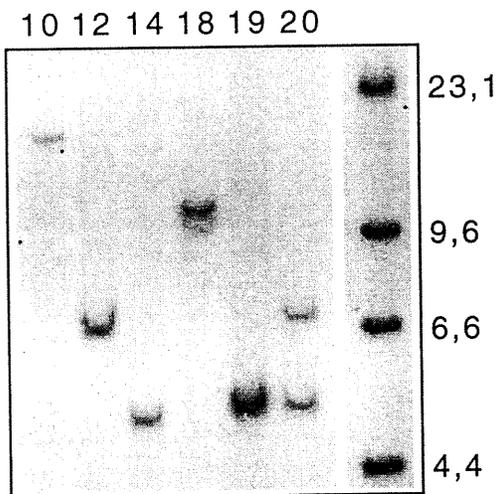


Figure 15: (Légende page suivante)

Figure 15 : Nombre de copies de pJF2

Analyse par Southern du nombre de copies de vecteur pJF2 intégré dans le génome de clones LMTK résistants à la sélection HAT. L'ADN génomique a été digéré par l'enzyme XbaI qui coupe une seule fois le vecteur. Le nombre de jonctions a été déterminé en hybridant les jonctions gauches avec la sonde HSV-tk et les jonctions droites avec la sonde néomycine. Les traits fins entrecoupés représentent la longueur variable de chaque jonction et les traits larges, les fragments d'ADN utilisés comme sonde. L'ADN du phage λ digéré par HindIII et marqué radioactivement est utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

Analyse des colonies pJF2 résistantes à la sélection G418

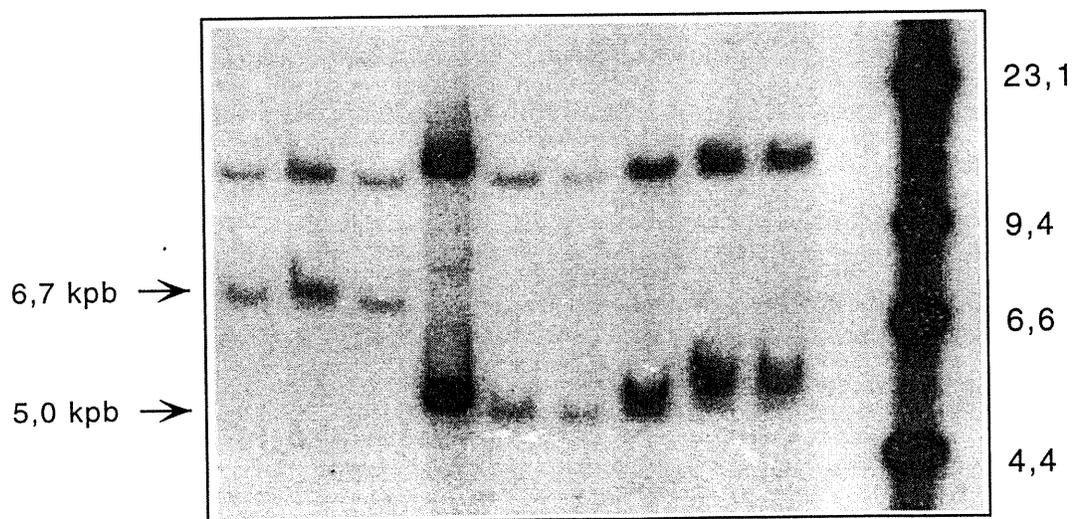
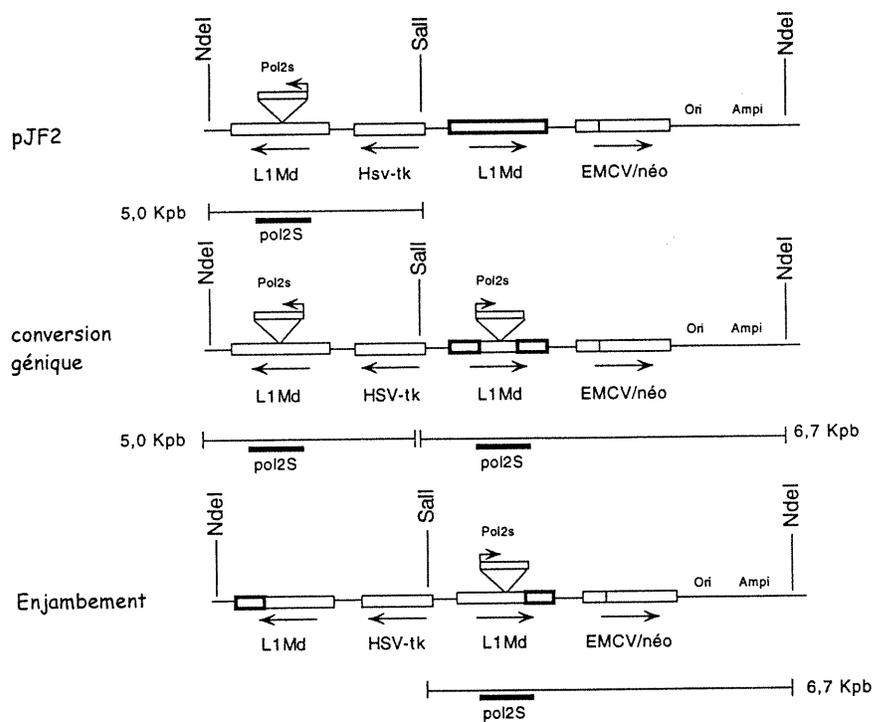


Figure 16: (Légende page suivante)

Figure 16 : Analyse des colonies pJF2 résistantes à la sélection G418

Analyse par Southern de la structure de pJF2 dans les colonies résistantes à la sélection G418 produites à partir des clones cellulaires LMTK/pJF2. La digestion enzymatique avec NdeI et XbaI permet de générer des patrons de bandes différents pour le plasmide pJF2 parental et les plasmides recombinés par conversion génique ou par enjambement. Les traits fins représentent les bandes attendues et les traits larges, le fragment d'ADN Pol2S utilisé comme sonde. L'ADN du phage λ digéré par HindIII est utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

sélection G418 analysées ont une bande d'ADN supplémentaire de haut poids moléculaire. Suite à cette analyse, nous avons vérifié par Southern si le vecteur pJF2 était encore intact dans les cellules où la recombinaison semble s'être produite pour permettre aux cellules de résister à la sélection G418 (Figure 17). Cette analyse nous indique que le plasmide est encore intact dans les colonies résistantes à la sélection G418, mais qu'il a aussi subi de l'amplification par un mécanisme inconnu qui ne peut s'expliquer par la recombinaison homologue mais qui permettrait à certaines colonies de résister à la sélection G418. Un autre Southern a été effectué sur l'ADN des clones parentaux et des colonies résistantes à la sélection G418 pour déterminer la position du promoteur Pol2S dans le vecteur pJF2 intégré (Figure 18). Les colonies résistantes à la sélection G418 qui avaient un patron d'événement d'enjambement à la figure 16 ont maintenant une bande d'ADN caractéristique d'un clone parental (7,5 kpb) alors qu'une bande de 6,0 kpb était attendue pour ces clones. On peut donc conclure que les colonies résistantes à la sélection G418 récupérées ne représentent pas des événements de recombinaison.

Puisque notre essai pJF2 ne semble pas permettre de détecter des événements de recombinaison, nous avons élaboré une nouvelle stratégie pour mettre au point un autre essai de recombinaison non-sélectif. Afin d'éliminer l'interférence transcriptionnelle, nous avons utilisé une unité bicistronique incluant les deux marqueurs de sélection néomycine et HSV-*tk* sous le contrôle d'un seul et même promoteur.

Intégrité de pJF2 dans les colonies résistantes à la sélection G418

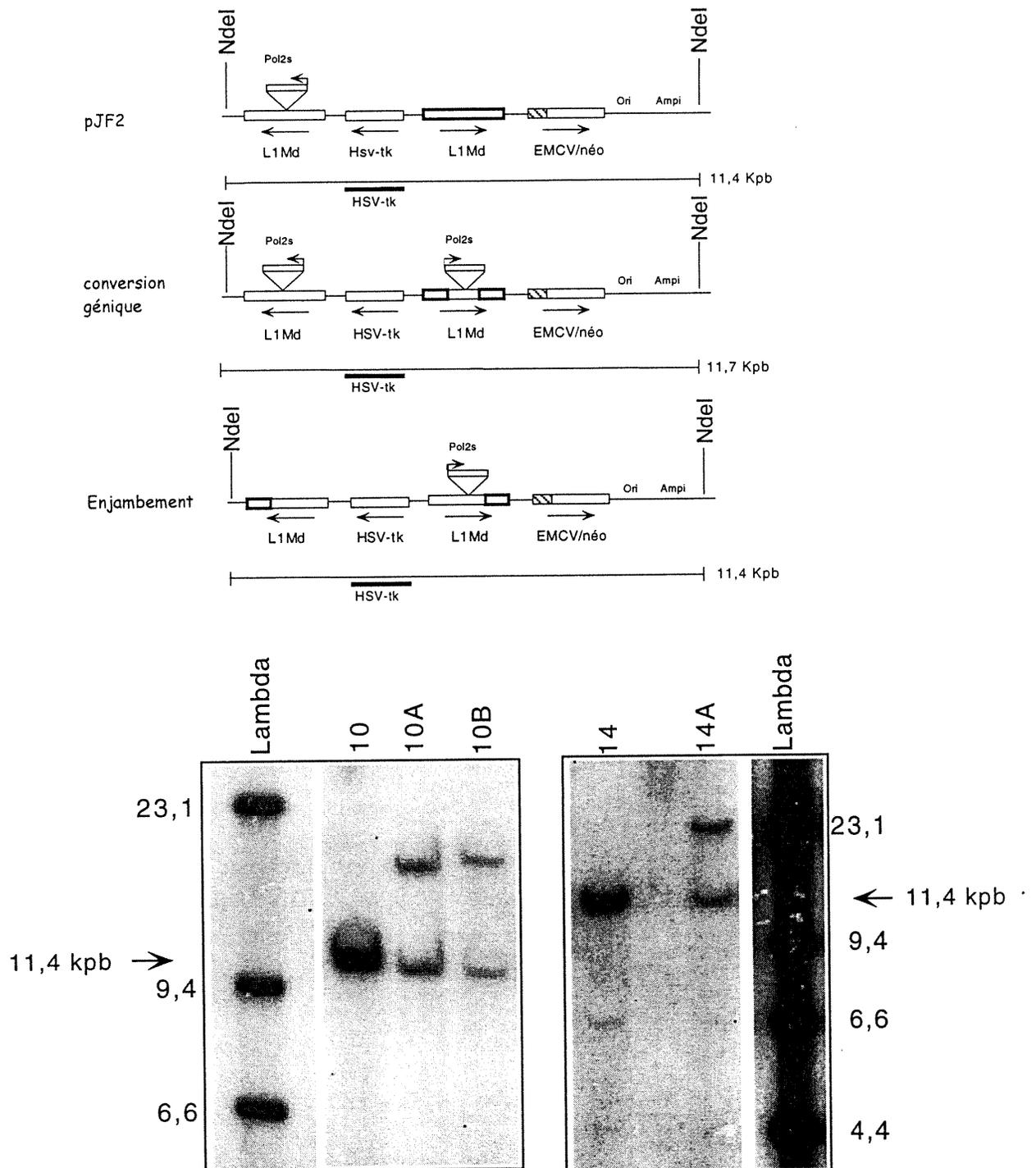


Figure 17: (Légende page suivante)

FIGURE 17 : Intégrité de pJF2 dans les colonies résistantes à la sélection G418

Analyse par Southern de l'intégrité du plasmide pJF2 dans les colonies résistantes à la sélection G418 produites à partir des clones cellulaires LMTK/pJF2. L'ADN a été digéré par l'enzyme NdeI et hybridé avec la sonde HSV-tk. L'ADN du phage λ digéré par HindIII est utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

Localisation du promoteur dans les colonies pJF2 résistantes à la sélection G418

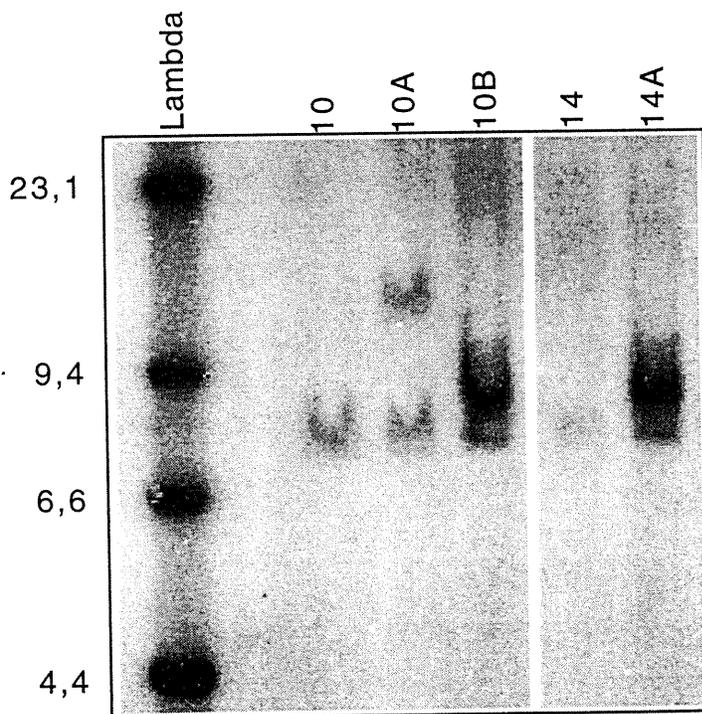
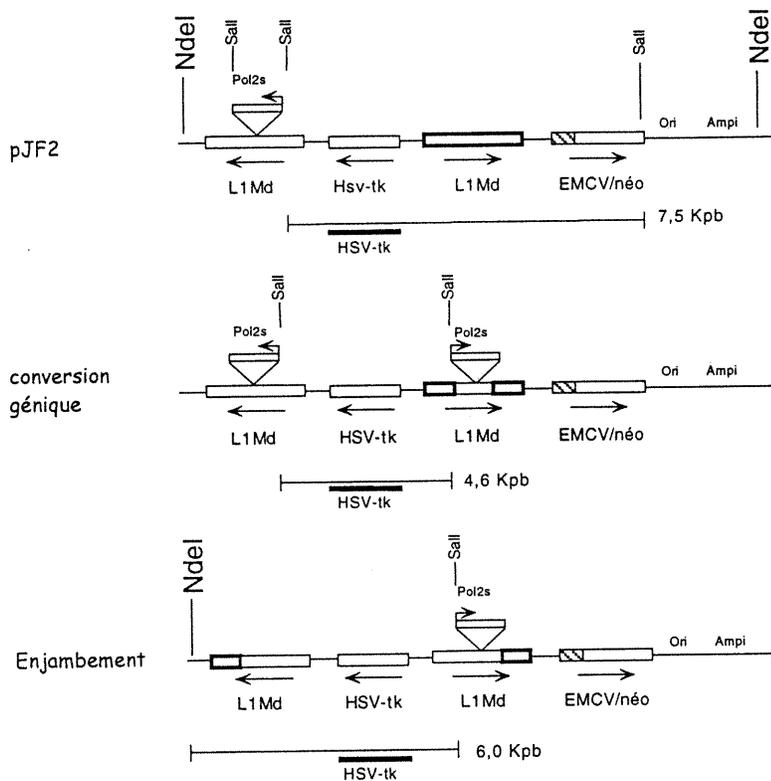


Figure 18: (Légende page suivante)

FIGURE 18 : Localisation du promoteur dans les colonies pJF2 résistantes à la sélection G418

Localisation par Southern du promoteur Pol2S dans le plasmide pJF2 des colonies résistantes à la sélection G418 produites à partir des clones cellulaires LMTK/pJF2. L'ADNg a été digéré par les enzymes Sall et NdeI et hybridé avec la sonde HSV-tk. L'ADN du phage λ digéré par HindIII est utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

3.1.2 ESSAI DE RECOMBINAISON BASÉ SUR LA PERTE D'UNE SÉQUENCE PROMOTRICE

Ce nouvel essai de recombinaison est basé sur la sélection négative de HSV-*tk* qui permettra d'isoler les cellules dans lesquelles les événements de recombinaison se produisent. Ce mode de sélection des recombinants qui diffère de celui de l'essai précédent, ne limite pas l'utilisation de l'essai aux cellules qui n'expriment pas leur thymidine kinase endogène et offre donc la possibilité d'utiliser l'essai dans une plus grande variété de lignées cellulaires.

Pour cet essai, les substrats de recombinaison, des séquences de l'élément LINE de souris L1Md-A2 (position 4179 à 6919; Loeb et al., 1986), sont placés en orientation inverse et convergente de part et d'autre des marqueurs de sélection HSV-*tk* et néomycine dans le plasmide pBV100 (Figure 19). Les deux marqueurs de sélection sont tous deux dépourvus de leur propre promoteur et forment une unité bicistronique sous le contrôle du promoteur court de l'ARN polymérase II (Pol2S) de souris (Soriano et al., 1991) qui est située dans la séquence LINE en amont des deux marqueurs. Les gènes HSV-*tk* et néomycine sont précédés individuellement d'un site d'initiation interne de la traduction différent provenant respectivement du virus de la poliomyélite (polio) et de l'encéphalomyocardite (EMCV) (Figure 19). Les sites d'initiation interne de la traduction permettent une traduction de l'ARNm qui respecte les cadres de lecture de chaque gène, afin de générer leurs produits fonctionnels. Cet essai permet de détecter et de discriminer entre les événements de recombinaison homologue de type conversion génique,

pBV100

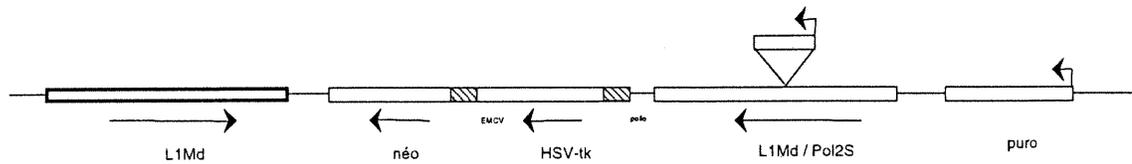


Figure 19:

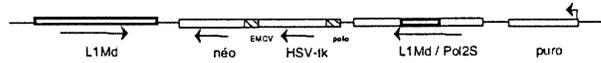
Le plasmide de recombinaison pBV100. Les flèches indiquent l'orientation 5'-3' des fragments d'éléments LINE et des marqueurs de sélection HSV-tk et néomycine (néo). Les boîtes hachurées représentent deux séquences différentes de sites d'initiation interne de la traduction provenant des virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) et de la poliomyélite (polio).

conversion génique associée à un enjambement, enjambement et double enjambement (Figure 20) qui provoquent une modification de l'alignement du promoteur Pol2S avec l'unité bicistronique, causant l'interruption de l'expression des deux marqueurs. Le gène néomycine est utile dans un premier temps pour isoler les cellules qui ont intégré le vecteur puisqu'il leur permet de résister à la sélection G418. Ensuite, la sélection par le GAF (gancyclovir, acyclovir et FIAU) permettra d'isoler les cellules dont le gène HSV-*tk* sera rendu inactif suite à la recombinaison. Les agents de sélection gancyclovir, acyclovir et FIAU permettent tous d'isoler les cellules dont le gène HSV-*tk* est inactif. En combinant ces trois agents de sélection, ils est possible de réduire considérablement le taux de mutation du gène HSV-*tk* qui passe d'environ 10^{-3} - 10^{-4} à moins de 10^{-7} (Brisebois et Dubow, 1993). Cette diminution du taux de mutation peut s'expliquer par la capacité de résister à un seul agent de sélection négative lorsque le gène porte une mutation simple alors qu'il faudrait une altération plus importante du gène, comme une mutation non-sens ou un réarrangement plus important (comme la recombinaison dans notre essai), pour lui permettre de résister à plusieurs agents de sélection négative (Brisebois et Dubow, 1993).

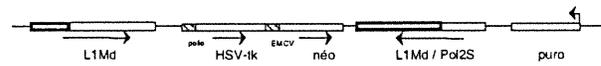
La fonctionnalité de l'unité bi-cistronique HSV-*tk*/néo a d'abord été testée en intégrant dans les cellules de souris LMTK, un vecteur contenant seulement la portion du plasmide pBV100 qui inclut l'unité bicistronique *tk*/néo précédée du

Recombinants pBV100

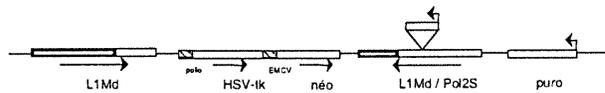
Conversion génique



Conversion associée à un enjambement



Enjambement



Double enjambement

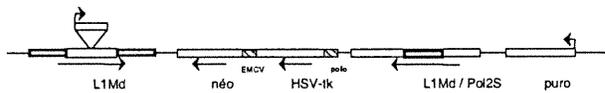


Figure 20:

Représentation schématique des événements de recombinaison où la position relative entre la séquence promotrice Pol2S et les séquences des marqueurs HSV-tk et néomycine (néo) est modifiée de sorte que le promoteur ne permet plus l'expression des marqueurs. L'essai pBV100 permet de discriminer entre les événements de conversion génique, conversion associée à un enjambement, enjambement et double enjambement.

LINE et du promoteur Pol2S. La sélection G418 a permis d'isoler des cellules dans lesquelles l'ADN s'est intégré. Ensuite 43 clones cellulaires G418 résistants ont été soumis à la sélection GAF qui permet de sélectionner les cellules dont le gène HSV-*tk* est inactif. De ces 43 clones cellulaires résistants à la sélection G418, seulement 7 (16%) se sont avérés être sensibles à la sélection GAF et donc posséder un gène HSV-*tk* fonctionnel. La proportion très élevée de clones GAF résistants (84%) ne peut s'expliquer par la mutation du gène HSV-*tk* puisqu'avec la sélection GAF, le taux de mutation du gène HSV-*tk* est très faible, soit de l'ordre de 10^{-7} ou moins (Brisebois et Dubow, 1993). La faible expression du gène HSV-*tk* est probablement attribuable à l'inefficacité de la séquence IRES de polio à assurer sa transcription. Il a d'ailleurs été récemment démontré que le site d'initiation interne de la traduction (IRES) du virus de la poliomyélite utilisé pour exprimer le gène HSV-*tk* dans cet essai, possède une activité d'initiation de la traduction qui varie considérablement selon les lignées cellulaires (Borman et al., 1997). De plus, son activité peut, dans certaines lignées cellulaires, être dépendante de la co-expression de la protéinase 2A virale (Borman et al., 1997).

Étant donné que la sélection des recombinants avec cet essai permet aussi de récupérer un nombre très élevé de clones HSV-*tk* négatifs qui ne sont pas des recombinants, nous avons modifié notre stratégie et élaboré un essai de recombinaison homologue différent mais qui se base encore sur la sélection négative du gène HSV-*tk*.

3.1.3 ESSAI DE RECOMBINAISON BASÉ SUR L'EXCISION DES MARQUEURS DE SÉLECTION

Pour l'essai de recombinaison pL1dir100, les substrats de recombinaison, deux séquences identiques du LINE de souris L1Md-A2 (position 4179 à 6919; Loeb et al., 1986) sont placées en répétition directe et flanquent les marqueurs de sélection HSV-*tk* et néomycine, possédant leur propre promoteur, placés en orientation inverse et divergente l'un par rapport à l'autre (Figure 21). Cette disposition des marqueurs de sélection permet de favoriser l'expression des deux gènes (Dunaway et Olander, 1993). Cet essai permet de détecter uniquement les événements d'enjambement entre les deux séquences LINE qui entraînent la délétion des séquences comprises entre les points d'enjambement, soit une partie de chaque LINE, le gène HSV-*tk* et le gène néomycine (figure 21). Cet essai, contrairement à ceux précédemment décrits permet la détection d'un seul type d'événements de recombinaison, mais il permet d'étudier l'effet de la divergence de séquence et du système de MMR sur les enjambements qui sont les événements de recombinaison impliqués dans l'instabilité génomique (Labuda et al., 1995). Le marqueur de sélection néomycine du vecteur pL1dir100 permet de sélectionner les cellules dans lesquelles le vecteur est introduit alors que le marqueur HSV-*tk*, qui peut être sélectionné négativement avec le G418, permet ensuite d'isoler les cellules dans lesquelles un événement de recombinaison s'est produit en excisant les deux marqueurs.

pL1dir100 et Recombinant

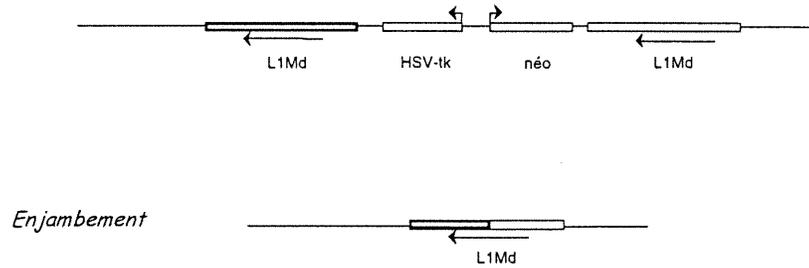


Figure 21:

Le plasmide de recombinaison pL1dir100 est illustré. Les flèches indiquent l'orientation 5'-3' des fragments d'éléments LINE. Ce plasmide ne permet d'isoler que les événements d'enjambement dans lesquels les marqueurs de sélection HSV-tk et néomycine et une séquence LINE subissent une délétion.

Puisque notre essai se base sur la sélection négative du gène HSV-tk pour récupérer les événements de recombinaison, nous avons dû ajouter un marqueur de sélection puromycine (position 2448 à 4801 du vecteur pGKpuro) dans le site NdeI du plasmide pL1dir100 qui deviendra pL1dirP100 (Figure 22), afin d'éviter de sélectionner les événements d'instabilité chromosomique (Vogelstein, 1997) en même temps que les recombinants. Selon Vogelstein (1997), l'instabilité chromosomique observée dans des lignées cellulaires de tumeurs colorectales, entraîne la perte ou le gain d'un chromosome à toutes les cinq divisions cellulaires en moyenne. Ceci signifie qu'après une seule division de 10^6 cellules, 2×10^5 cellules risquent de subir la perte ou le gain d'un chromosome. De ces cellules, la moitié, soit 10^5 cellules, subiront la perte d'un chromosome, alors que l'autre moitié fera l'acquisition d'un chromosome supplémentaire. Puisque les cellules comportent normalement 46 chromosomes, il y aura 2173 cellules des 10^6 cellules de départ qui subiront la perte du chromosome dans lequel le plasmide pL1dir100 sera intégré, ce qui les rendra HSV-*tk* négatives et permettra leur sélection avec les recombinants. Puisque la fréquence de recombinaison intrachromosomique est de l'ordre de 10^{-6} événements par locus, par génération cellulaire (Revue par Bollag et al., 1989), il faudrait analyser plus de 2000 événements d'instabilité chromosomique pour trouver un seul événement de recombinaison. Mais en ajoutant la sélection puromycine aux cellules, il est possible d'éliminer celles qui ont perdu le chromosome portant le plasmide pL1dirP100 lors de la sélection des recombinants et ainsi d'enrichir notre sélection pour les événements de recombinaison. Dans le plasmide pL1dirP100, les gènes puromycine et néomycine

pL1dirP100

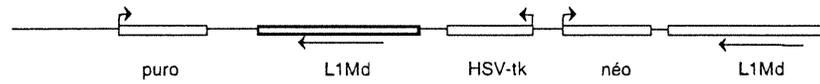


Figure 22:

Le plasmide pL1dirP100 correspond au plasmide pL1dir100 auquel le marqueur de sélection puromycine a été ajouté.

sont dans la même orientation et risquent de subir un effet d'interférence transcriptionnelle négative alors que la transcription des gènes HSV-*tk* et néomycine est stimulée par l'orientation divergente de leurs promoteurs (Dunaway et Olander, 1993). Il est possible que l'effet de stimulation de la transcription du gène néomycine par la transcription du gène HSV-*tk* absorbe l'effet de répression provenant de la transcription du gène puromycine, de sorte que le gène néomycine pourrait être exprimé normalement. Cependant, suite à la transfection des cellules HeLa avec le vecteur pL1dirP100, aucune cellule n'a résisté à la double sélection puromycine et G418. Ces résultats nous indiquent que l'interférence transcriptionnelle affecte négativement l'expression des marqueurs puromycine et néomycine et ne permet pas de sélectionner les cellules qui ont intégré le plasmide pL1dirP100 pour utiliser cet essai de recombinaison.

Compte tenu des contraintes qui limitent les essais de recombinaison sélectifs traditionnels et des résultats obtenus avec les essais précédemment décrits, nous avons adopté une stratégie différente pour mettre au point un essai de recombinaison homologue non-fonctionnel.

3.1.4 ESSAI DE RECOMBINAISON BASÉ SUR LA RECONSTITUTION D'UN INTRON DANS UN MARQUEUR DE SÉLECTION

Ce nouvel essai se base sur l'alignement de deux exons du gène de sélection néomycine par la recombinaison qui se produit au niveau de l'intron de ce marqueur. Les séquences introniques de recombinaison LINE flanquent l'exon 3'

du gène de sélection néomycine (néo 3'). L'exon 5' du gène néomycine (néo 5') est pour sa part placé au centre de la séquence LINE qui est en aval de l'exon néo 3'. Les deux exons étant placés en orientation inverse, le gène néomycine est non-fonctionnel dans les plasmides pST100 et pST85 (Figure 23). Les séquences LINE sont aussi placées en orientation inverse et convergente, de sorte que les événements de recombinaison, par conversion génique, conversion associée à un enjambement, enjambement ou double enjambement (Figure 24) entre ces deux séquences peuvent aligner les deux exons et reconstituer l'intron. De tels événements reconstituent un gène néomycine fonctionnel qui servira à sélectionner les cellules où ces événements de recombinaison homologue auront eu lieu.

Pour développer cet essai, il a d'abord fallu introduire un intron artificiel dans le gène de sélection néomycine qui n'en contient pas de façon naturelle. Pour ce faire, nous avons utilisé un oligomère d'ADN de 59 paires de bases comprenant la séquence provenant de l'intron 1 du gène de la β -globine de souris (Lawin et al., 1980) flanquée des sites donneur et accepteur d'épissage dérivés de la séquence consensus des introns de groupe II des mammifères. L'efficacité de cet intron artificiel a été testée dans trois sites de restriction différents du gène de sélection néomycine, afin de déterminer la position permettant la meilleure expression du gène (Figure 25). Les cellules de souris LMTK ont été transfectées en parallèle avec le plasmide de départ pMC1NéopA (Stratagene) et les trois constructions,

pST100 et pST85

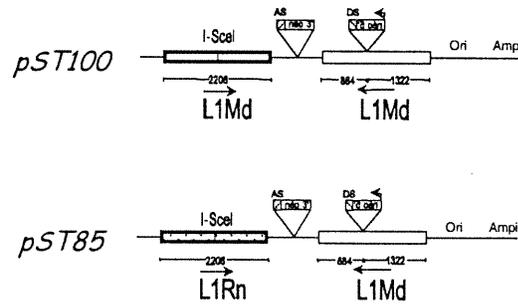


Figure 23:

Les plasmides de recombinaison pST100 et pST85. Les flèches indiquent l'orientation 5'-3' des fragments d'éléments LINE-1 (L1Md et L1Rn). Les boîtes hachurées représentent les séquences d'épissage de l'intron, AS site accepteur et DS site donneur. I-SceI est un site de restriction unique dans le plasmide.

Recombinants pST100

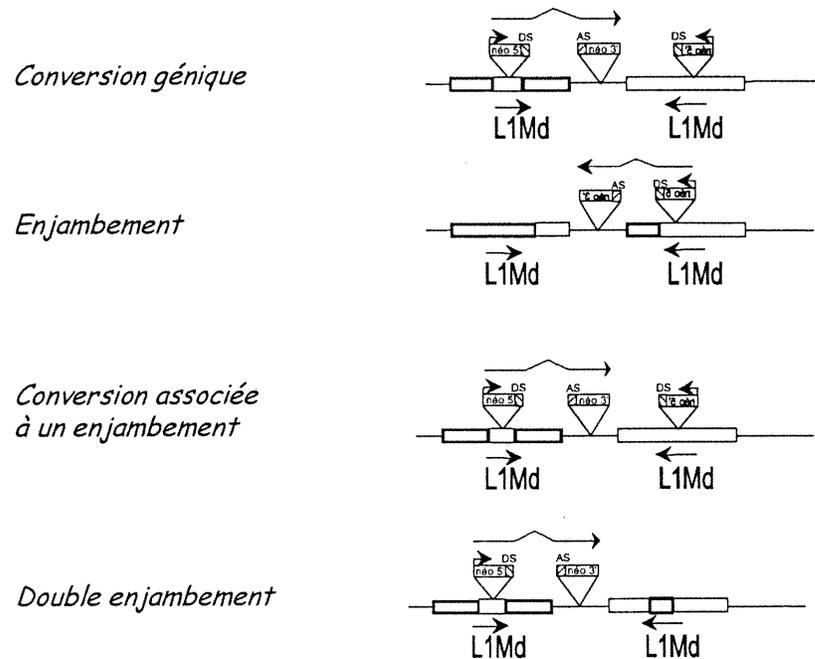


Figure 24:

Représentation schématique des événements de recombinaison où les exons néo5' et néo3' sont alignés de façon à permettre l'expression du gène néomycine. L'essai pST100/85 permet aux événements de recombinaison de se produire par conversion génique, conversion associée à un enjambement, enjambement et double enjambement.

pNéoM59, pNéoN59 et pNéoP59, contenant l'intron de 59 pb inséré respectivement dans les sites MscI, NaeI et PvuII. Chaque plasmide a été co-transfecté avec le plasmide contrôle, pGKpuro, qui confère aux cellules la résistance à la sélection puromycine. Les cellules transfectées ont par la suite été réparties sur deux boîtes de pétri puis respectivement soumises aux sélections G418 et puromycine. Le plasmide pGKpuro est un contrôle interne utilisé pour éliminer les variations de niveau d'expression du gène néomycine qui sont attribuables à la variation de l'efficacité de chaque transfection de cellules. À la figure 25 l'expression relative du gène néomycine de chaque construction est normalisée selon l'efficacité de la transfection, la taille du vecteur ainsi que la quantité d'ADN transfecté. Parmi les trois vecteurs qui contiennent le gène néomycine avec un intron, c'est celui dont l'intron est introduit dans le site de restriction PvuII (pNéoP59) qui permet la meilleure expression du gène néomycine. Toutefois, les trois constructions contenant un intron démontrent une expression du gène néomycine beaucoup plus faible que le plasmide pMC1NéopA. Il est possible que cette faible expression résulte d'un épissage inefficace pouvant être attribuable à la trop courte distance qui sépare le site donneur d'épissage et le site d'embranchement de l'intron, ce qui pourrait interférer avec la formation de la boucle nécessaire à l'épissage de l'intron.

Nous avons introduit des inserts de différentes tailles dans le site de restriction NotI de l'intron de la construction pNéoP59, afin de déterminer quelle est la longueur de l'intron qui permet l'expression optimale du gène néomycine.

Effacité d'épissage de l'intron artificiel dans le gène néomycine

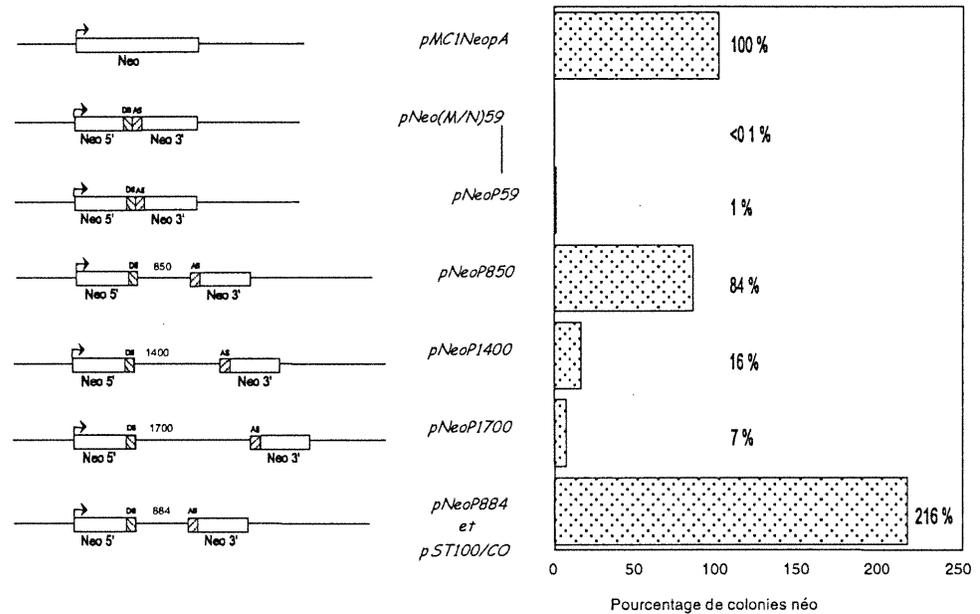


Figure 25:

L'effet de l'intron sur l'expression du gène néomycine a été testé dans les cellules LMTK. Les plasmides illustrés ont été cotransfectés avec un plasmide contrôle, pGKpuro, qui permet de normaliser l'efficacité de transfection du gène néomycine qui est déterminée en calculant le nombre de colonies résistantes à la sélection G418. L'efficacité de transfection du gène néomycine provenant du plasmide de référence pMC1NeopA a été arbitrairement fixée à 100% et celle du gène néomycine des autres plasmides qui a été normalisée pour tenir compte de la taille de chacun est exprimée en fonction du plasmide de référence. Les nombres indiqués dans les constructions font référence à la longueur des fragments d'ADN insérés dans l'intron

Le site de restriction NotI est situé entre le site donneur d'épissage et le site d'embranchement, une région qui est reconnue pour être de longueur variable dans les introns (Wierenga et al., 1984). Nous avons introduit des séquences de 850 et 1700 pb provenant du plasmide pBR322 (NEB) de même qu'une séquence de 1400 pb provenant de l'élément LINE de souris L1Md-A2 (positions 5501 à 6919; Loeb et al., 1989) dans l'intron et transfecté les vecteurs obtenus dans les cellules LMTK. La présence des inserts dans l'intron a permis d'augmenter l'expression relative des gènes néomycine. Cependant, le niveau d'expression du gène néomycine est inversement proportionnelle à la longueur de l'insert dans l'intron (Figure 25, construction pNéoP850, pNéoP1400 et pNéoP1700). La diminution de l'expression du gène néomycine avec les introns plus longs peut être due à une moins bonne efficacité d'épissage de l'intron lorsque celui-ci est plus long ou encore à la présence, dans les inserts, de séquences qui pourraient interférer avec l'épissage normal de l'intron. Dans le but d'améliorer l'efficacité d'expression du gène néomycine contenant l'intron, nous avons analysé la séquence LINE de 1400 pb utilisée dans le vecteur pNéoP1400 pour déterminer si elle contenait des séquences susceptibles d'interférer avec le processus d'épissage. Nous avons découvert un site donneur d'épissage cryptique situé à la position 6419, soit à 500 pb de l'extrémité 3' de l'insert. L'élimination du site cryptique d'épissage de l'intron LINE et son raccourcissement à 884 pb (position 5501 à 6385), pNéoP884, a permis d'augmenter l'expression du gène néomycine qui est maintenant deux fois plus efficace qu'avec le vecteur de référence pMC1NéopA (Figure 25). L'expression plus élevée du gène néomycine en présence de cet intron par rapport

au gène néomycine de départ pourrait résulter de la stabilisation de l'ARN messager du gène par l'intron (Buchman et Berg, 1988). C'est donc la séquence LINE de 884 pb, permettant la meilleure expression du gène néomycine, qui est retenue pour constituer l'intron dans les vecteurs de recombinaison pST100 et pST85.

Le vecteur pST100/CO qui est la reconstitution d'un événement d'enjambement, a été construit en inversant l'orientation des séquences flanquées par les deux substrats de recombinaison du vecteur pST100 (voir figure 24, page 107). Ce vecteur a été utilisé pour déterminer si l'essai de recombinaison est fonctionnel et s'il permettrait de détecter les événements de recombinaison dans le contexte des vecteurs complets, par l'ajout de la sélection G418 aux cellules LMTK. L'efficacité d'expression du gène néomycine qui est comparable dans les vecteurs pST100/CO et pNéoP884 (Figure 25) nous indique que l'essai de recombinaison semble être fonctionnel et que les recombinants, du moins les événements d'enjambement, peuvent être détectés avec cet essai.

3.2 ÉTUDE DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE AU NIVEAU EXTRACHROMOSOMIQUE

3.2.1 RECOMBINAISON HOMOLOGUE SPONTANÉE

Des études préliminaires ont d'abord été effectuées avec l'essai de recombinaison basé sur la reconstitution d'un intron dans les cellules de souris LMTK. Les cellules LMTK ont déjà été utilisées pour plusieurs études de

recombinaison et semblent avoir un système de MMR fonctionnel puisque dans ces cellules, différentes combinaisons de paires de bases non-appariées entre des substrats de recombinaison affectent de façon différentes le niveau de recombinaison homologue (Lukacovich et Waldman, 1999). En effet, des hétérologies comportant différentes combinaisons de nucléotides ont des effets différents sur la recombinaison inférant que les hétérologies de nucléotides affectent la recombinaison à une étape subséquente à la formation d'un intermédiaire d'ADN bicaténaire et que les effets différents résultent probablement de traitement ou de réparation différents et spécifiques aux appariements erronés de bases. Pour effectuer les essais de recombinaison extrachromosomiques, les plasmides pST85 et pST100 ont été introduits en parallèle dans les cellules, par co-transfection avec le plasmide pAGO (Colbere-Garapin et al., 1979), un contrôle interne qui sert à éliminer la variation due à l'efficacité de la transfection et à calculer la fréquence de recombinaison homologue. Immédiatement après la transfection, les cellules ont été réparties sur trois boîtes de pétri dont l'une recevra la sélection HAT qui permet d'isoler les cellules qui ont incorporé l'ADN du plasmide contrôle, alors que les deux autres boîtes recevront la sélection G418 qui permet de sélectionner les événements de recombinaison qui se sont produits au niveau extrachromosomique avant l'intégration du vecteur dans le génome de la cellule hôte. La fréquence de recombinaison est calculée en divisant le nombre de colonies résistantes à la sélection G418 obtenues par le nombre correspondant de colonies résistantes à la sélection HAT.

Dans les cellules de souris LMTK, la fréquence de recombinaison obtenue avec le vecteur pST85 (18,9%) est moins élevée que celle obtenue avec pST100 (92,2%) (Tableau III). La présence de 15% de divergence de séquence, entre les substrats de recombinaison de pST85, entraîne une diminution statistiquement significative (test de χ^2 , $\alpha \ll 0,005$) de la fréquence de recombinaison de près de cinq fois comparativement à celle obtenue avec les séquences identiques de pST100 (Tableau III) dans des cellules de souris dont le système de MMR est fonctionnel. Ces résultats sont comparables à ceux de la littérature (Waldman et Liskay, 1987) et nous démontrent que notre essai de recombinaison basé sur la reconstitution d'un intron dans le gène de sélection néomycine est fonctionnel et qu'il peut être utilisé pour déterminer l'effet de la divergence de séquence et du système de MMR sur la recombinaison homologue dans des cellules de mammifères.

Tableau III: Effet de la divergence entre les séquences et du système de MMR sur la recombinaison homologue spontanée extrachromosomique

Cellules	Plasmides	G418 ^r	Puro ^r	Fréquence de recombinaison ^a	Ratio pST100:pST85
LMTK	pST100	224	243 ^b	92,2%	4,9: 1
	pST85	33	175 ^b	18,9%	
SW480	pST100	76	1250	6,08%	5,5: 1
	pST85	16	1419	1,13%	
SKUT-1	pST100	48	3681	1,30%	1,9: 1
	pST85	33	4729	0,70%	
HCT116	pST100	65	5911	1,10%	3,3: 1
	pST85	22	6639	0,33%	

^a La fréquence de recombinaison correspond au nombre de colonies G418^r divisé par le nombre de colonies Puro^r ou HAT^r.

^b Sélection HAT.

3.2.2 EFFET DU SYSTÈME DE MMR SUR LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE

Pour vérifier si la diminution de la fréquence de recombinaison homologue observée dans les cellules LMTK avec les substrats de recombinaison divergents résulte d'une action du système de MMR qui pourrait possiblement agir sur les intermédiaires d'ADN bicaténaire formés lors de la recombinaison entre les séquences divergentes de pST85, nous avons utilisé trois lignées cellulaires humaines dont le statut du système de MMR est connu. Les cellules SW480 proviennent d'un adénocarcinome colorectal (Parson et al., 1993; Umar et al., 1994) et ont un système de MMR fonctionnel alors que ce système est non-fonctionnel dans les cellules HCT116 et SKUT-1 qui proviennent respectivement d'une tumeur colorectale (Koi et al., 1994) et d'un adénocarcinome de l'endomètre (Rinsinger et al., 1995). Les cellules HCT116 et SKUT-1 ont toutes les deux une mutation qui prévient l'expression d'une des protéines ayant un rôle important dans la réparation des appariements erronés de bases, soit Mlh1 pour les cellules HCT116 et Msh2 pour les cellules SKUT-1 (Figure 26) (Richards et al., 1997; Rinsinger et al., 1995). Les plasmides pST85 et pST100 ont été introduits en parallèle dans chacune de ces lignées cellulaires humaines, en co-transfection avec un plasmide contrôle, tel que décrit précédemment pour les cellules LMTK. Puisque les lignées cellulaires humaines expriment normalement leur gène endogène de la thymidine kinase, le plasmide contrôle utilisé exprime un marqueur de sélection autre que la thymidine kinase virale. Il s'agit du plasmide pGKpuro qui contient le gène puromycine qui confère

Expression des protéines Msh2 et Mlh1
dans les cellules SKUT-1 et HCT116

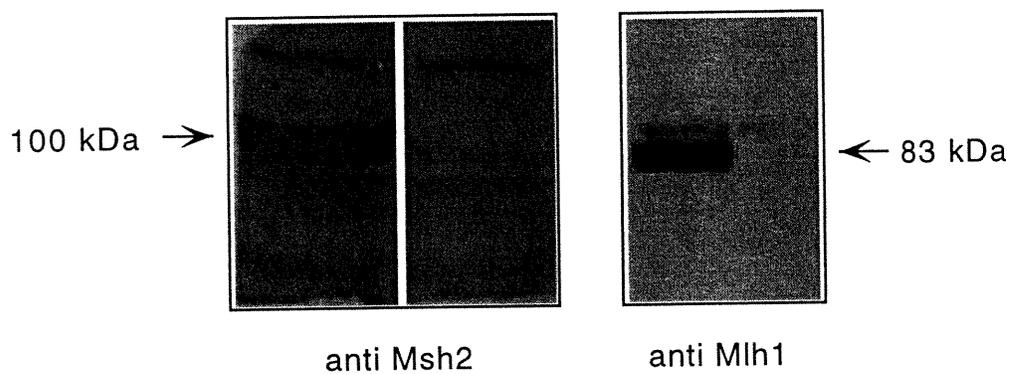


Figure 26:

L'expression des protéines Msh2 (100 kDa) et Mlh1 (83 kDa) a été vérifiée par Western dans les cellules HCT116 et SKUT-1 avec des anticorps polyclonaux spécifiques pour chacune des protéines.

la résistance à l'agent de sélection puromycine. Dans les cellules SW480, dont le système de MMR est fonctionnel, la présence de 15% de divergence de séquence entre les substrats de recombinaison de pST85 entraîne une diminution statistiquement significative (test de χ^2 , $\alpha \ll 0,005$) de près de six fois de la fréquence de recombinaison (1,13%) par rapport à la fréquence obtenue avec les séquences identiques de pST100 (6,08%) (Tableau III). Cette diminution de la fréquence de recombinaison homologue est similaire aux diminutions qui ont été observées avec des essais de recombinaison extrachromosomique en présence de 15% et 19% de divergence de séquence dans les cellules de souris LMTK (Tableau III; Waldman et Liskay, 1987) qui font aussi la réparation des appariements erronés de bases. On observe que les fréquences de recombinaison obtenues avec les séquences identiques de pST100 varient grandement entre les cellules LMTK et les cellules SW480. Une cause possible de cette variation pourrait être due à la façon de calculer les fréquences de recombinaison, soit en divisant le nombre de colonies résistantes à la sélection G418 obtenues par le nombre de colonies résistantes à la sélection HAT pour les cellules murines ou résistantes à la sélection puromycine pour les cellules humaines. Il est possible que les gènes de sélection portés par les vecteurs contrôles pAGO et pGKpuro ne confèrent pas aux cellules les mêmes niveaux de résistance à leur agent de sélection respectif. Le niveau de résistance qui se traduit par l'obtention d'un nombre plus ou moins élevé de colonies cellulaires résistantes à l'agent de sélection, dépend de l'efficacité de transfection du vecteur, du niveau d'expression du gène de sélection et de l'efficacité de la protéine à

métaboliser l'agent de sélection. Pour un même nombre d'événements de recombinaison, la fréquence de recombinaison sera plus élevée si elle est calculée avec un marqueur de sélection dont l'efficacité de résistance est faible (petit nombre de colonies cellulaires) que si elle est calculée avec un marqueur dont l'efficacité de résistance est plus forte (nombre élevé de colonies cellulaires). Pour vérifier si les efficacités de résistance des marqueurs de sélection puromycine de pGKpuro et HSV-tk de pAGO sont comparables dans une même lignée cellulaire, nous avons co-transfectées la même quantité des deux plasmides dans les cellules de souris LMTK. Suite à la co-transfection, les cellules ont été équitablement réparties sur deux boîtes de pétri et ont par la suite été soumises aux sélections HAT et puromycine respectivement. Puisque les deux vecteurs génèrent le même nombre de colonies par μg d'ADN transfecté dans les cellules LMTK (6,7 pour pAGO et 6,9 pour pGKpuro), il semble improbable que la différence des fréquences de recombinaison observée entre les cellules de souris et les cellules humaines s'explique par cette hypothèse. Cependant, on ne peut pas complètement éliminer la possibilité que le marqueur de sélection puromycine rende les cellules humaines plus résistante à la sélection que les cellules LMTK testées ici. Il est cependant impossible de comparer l'efficacité de résistance des vecteurs pGKpuro et pAGO dans les cellules humaines utilisées pour la recombinaison puisque le gène de la thymidine kinase endogène est exprimé dans ces cellules, ce qui ne permet pas de mesurer l'efficacité d'expression du gène HSV-tk.

Dans les cellules SKUT-1 et HCT116 dont le système de MMR est non-fonctionnel, on observe que la divergence de séquence entre les substrats de recombinaison de pST85 provoque une diminution statistiquement significative de seulement 2 (test de χ^2 , $\alpha = 0,0052$) et 3 (test de χ^2 , $\alpha \ll 0,005$) fois de la fréquence de recombinaison comparativement à celles obtenues avec les séquences identiques de pST100 (Tableau III, page 114). La diminution de la fréquence de recombinaison entre les séquences 15% divergentes est plus importante dans les cellules dont le système de MMR est fonctionnel, diminution de 5 et 6 fois, que dans les cellules qui ne réparent pas les appariements erronés de bases, diminution de 2 et 3 fois. Et les différences sont statistiquement significatives (comparaison de « odds ratio » SW480/SKUT1 $\alpha = 0,002$; SW480/HCT116 $\alpha = 0,003$). Ces résultats suggèrent que le système de MMR des mammifères serait impliqué dans l'inhibition de la recombinaison homologue entre des séquences divergentes.

3.2.3 ANALYSE DES RECOMBINANTS PAR LA TECHNIQUE DE PCR

Afin de s'assurer que les colonies résistantes à la sélection G418 qui sont détectées dans les cellules de souris et humaines correspondent à de véritables événements de recombinaison, nous avons effectué des analyses par PCR sur l'ADN génomique de ces colonies. Les amorces néo952 et néo1300 respectivement situées dans l'exon 5' et l'exon 3' du gène néomycine possèdent la même orientation dans le plasmide parental et ne permettent pas d'amplifier un fragment d'ADN (Figure

27). Cependant, suite à un événement de recombinaison, l'orientation relative des deux amorces est modifiée de façon à permettre l'amplification d'un fragment d'ADN de 1,3 kpb (Figure 27). De plus, l'amorce néo952 peut à elle seule, dans certains cas de conversion génique, amplifier un fragment supplémentaire de 2,2 kpb (Figure 27). Les résultats de la figure 28 démontrent que les conditions de PCR utilisées permettent d'amplifier la bande de 1,3 kpb avec l'ADN provenant des recombinants alors que l'ADN des plasmides parentaux, non-recombinés, ne permet aucune amplification. Ceci nous indique que les clones cellulaires résistants à la sélection G418 qui ont été obtenus représentent de véritables événements de recombinaison dans lesquels l'alignement des deux exons du gène néomycine s'est produit. Pour certains événements de recombinaison, la bande de 1,3 kpb n'a pas pu être amplifiée, dans ces cas, une bande de poids moléculaire différent a toutefois été amplifiée (Figure 28) et pourrait correspondre à un événement de recombinaison de type imprécis où la séquence LINE de l'intron aurait subi des pertes ou des acquisitions de séquences au cours du processus de recombinaison homologue (Belmaaza et al., 1994; Villemure et al., 1997). L'hybridation de ces bandes de poids moléculaire différent de la bande attendue avec une sonde correspondant uniquement aux séquences du gène néomycine amplifiées par les deux amorces nous indique que ces fragments d'ADN sont diagnostiques d'événements de recombinaison de type imprécis et que contrairement aux essais sélectifs courants, notre essai de recombinaison permet leur détection.

Analyse des recombinants pST100 et pST85 par PCR

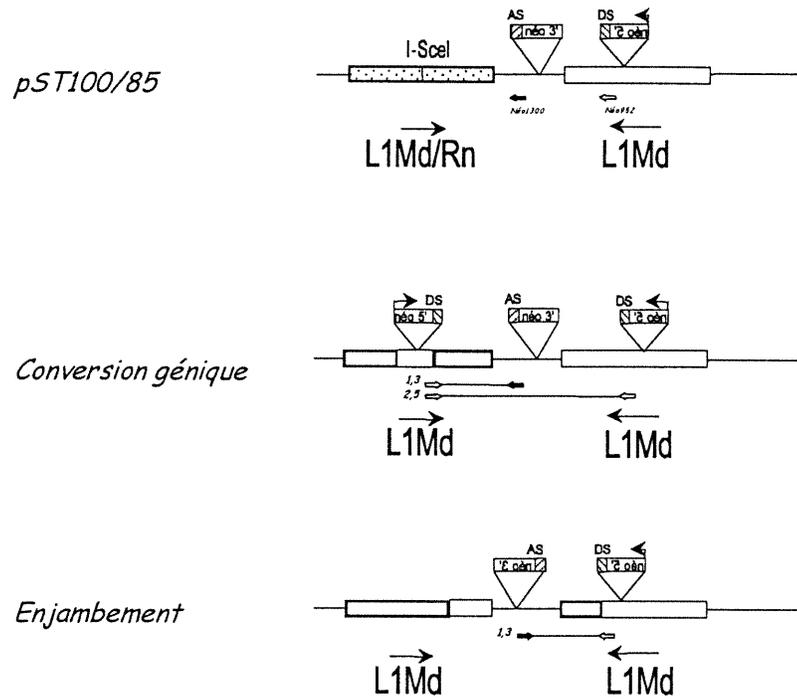


Figure 27:

Représentation schématique des plasmides parentaux et des molécules recombinantes par conversion génique et enjambement. La position des amorces néo952- (flèche blanche) et néo1300+ (flèche noire) utilisées pour l'analyse par PCR et les bandes d'ADN qu'elles amplifient sont illustrées pour chaque configuration.

PCR sur les recombinants pST100 et pST85

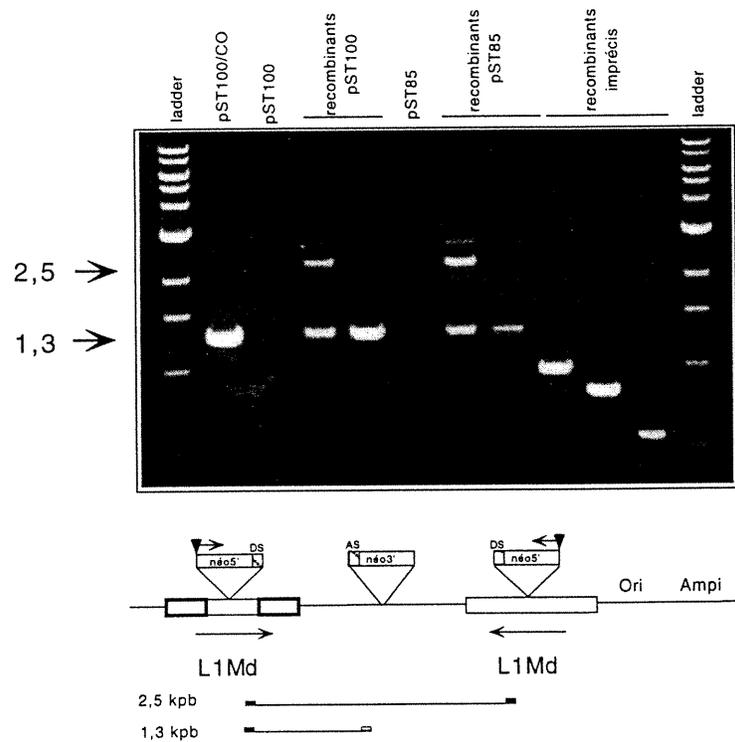


Figure 28:

Analyse par PCR des colonies résistantes la sélection à G418 avec les amorces néo952- et néo 1300+ localisées respectivement dans les exons néo5' et néo3' et permettant d'amplifier des fragments d'ADN lorsque le gène néomycine est reconstitué. Les puits situés à chaque extrémité contiennent un marqueur de poids moléculaire. Le deuxième puit, pST/CO, est un contrôle positif pour la réaction de PCR alors que les puits pSt100 et pST85 sont des contrôles négatifs de PCR effectué sur de l'ADN plasmidique mélangé avec de l'ADN génomique. Les autres puits sont des réactions de PCR effectuées sur l'ADN génomique des colonies G418 résistantes obtenues avec les plasmides pST100 et pST85 dans les cellules de souris et humaines. Les trois derniers ADN testés ont une taille inférieure aux 1,3 kpb attendus et représentent des événements où des séquences LINE-1 introniques ont été perdues lors du processus de recombinaison.

3.2.4 COMPLÉMENTATION DES CELLULES HCT116 ET SKUT-1

Afin de s'assurer que la diminution de la fréquence de recombinaison, moins importante dans les cellules HCT116 et SKUT-1 que dans les cellules SW480, est due à l'absence de réparation des appariements erronés de bases, nous avons voulu compléter les cellules HCT116 et SKUT-1 avec l'ADN complémentaire des gènes hMLH1 et hMSH2 respectivement. Si le système de MMR est responsable de la diminution de la fréquence de recombinaison entre les séquences divergentes comme les résultats précédents le suggèrent, la complémentation des cellules, en rétablissant la réparation des appariements erronés de bases, devrait rétablir une diminution de la fréquence de recombinaison obtenue avec le vecteur pST85 par rapport à celle obtenue avec le vecteur pST100 qui serait similaire à ce qui est observé dans les cellules SW480 et LMTK, tandis que la fréquence de recombinaison de pST100 ne devrait pas être affectée par la complémentation des cellules.

L'ADN complémentaire du gène hMLH1 porté par le plasmide pC4MLHwt (Figure 29) qui demeurera épisomique dans les cellules, a été introduit dans la lignée cellulaire HCT116 et l'expression de la protéine exogène a été vérifiée par la technique de Western. La figure 30 nous a permis d'identifier certains clones cellulaires qui expriment la protéine à partir de l'ADN complémentaire.

pC4MLHwt

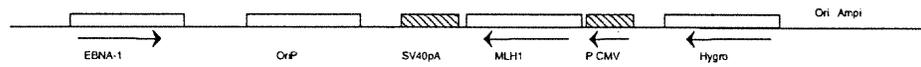


Figure 29:

pC4MLHwt a été construit en insérant l'ADN complémentaire de la protéine Mlh1 humaine entre le promoteur P CMV et les séquences de polyadénylation de SV40 (SV40pA) du vecteur pCEP4. L'antigène EBNA-1 du virus Epstein barr et l'origine de réplication OriP permettent de maintenir le vecteur sous forme épisomique dans les cellules humaines.

Complémentation des cellules HCT116 avec pC4MLHwt

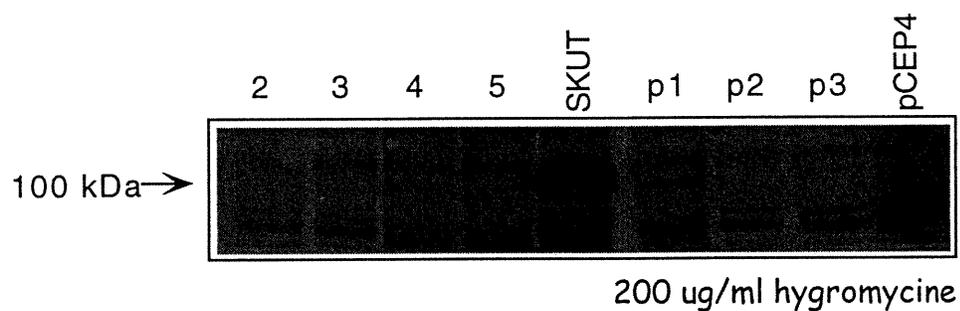


Figure 30:

Analyse de l'expression de la protéine Mlh1 humaine (100 kDa) exprimée à partir du vecteur pC4MLHwt dans les cellules HCT116. Des extraits de protéines de clones cellulaires individuels (numéro 2 à 5) ou de groupe d'environ 10 clones (p1 à p3) pC4MLHwt résistants à une sélection de 200 ug/ml d'hygromycine, ont été analysés par la technique de Western. Les protéines extraites des cellules SKUt-1 et HCT116 transfectées avec le plasmide pCEP4 ne contenant pas l'ADN complémentaire de MLH1 sont respectivement utilisées comme contrôles positif et négatif.

Cependant, le niveau d'expression de la protéine est moins élevé comparativement à l'expression endogène de hMlh1 dans les cellules SKUT-1 qui sont utilisées comme contrôle positif. Afin d'augmenter la production de protéines à partir du vecteur épisomique qui est sélectionné par le marqueur hygromycine, nous avons graduellement augmenté la concentration de l'agent de sélection hygromycine sur les cellules HCT116 transfectées pour provoquer l'augmentation du nombre de copie du vecteur épisomique exprimant le gène hMLH1 dans les cellules. La détection des protéines par la technique de Western démontre que l'augmentation de la concentration de l'agent de sélection hygromycine de 200 µg/ml jusqu'à 1500 µg/ml n'a pas permis d'exprimer la protéine exogène à un niveau plus élevé (Figure 31).

Pour vérifier si malgré son faible niveau d'expression, la protéine hMlh1 permet de restaurer la réparation des appariements erronés de bases dans les cellules HCT116, des études fonctionnelles du système de MMR ont été effectuées. Dans un premier temps, nous avons comparé la résistance des cellules HCT116 et HCT116 complémentées à l'agent alkylant MNNG. Les agents alkylants étant toxiques pour les cellules dont le système de MMR est fonctionnel (Branch et al., 1993; Karran et Marinus, 1982; Kat et al., 1993), on s'attend à ce que les cellules HCT116 résistent à de fortes concentrations d'agent alkylant et que les cellules complémentées soient sensibles à ce traitement.

Expression de Mlh1 avec une concentration élevée d'hygromycine

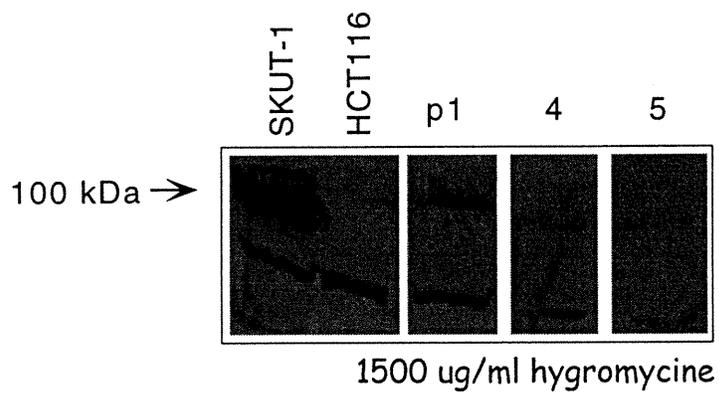


Figure 31:

Analyse de l'expression de la protéine Mlh1 humaine (100 kDa) exprimée à partir du vecteur pC4MLHwt dans les cellules HCT116. Des extraits de protéines de clones cellulaires individuels 4 et 5 et de p1 pC4MLHwt résistants à une sélection élevée d'hygromycine (1500 ug/ml), ont été analysés par la technique de Western. Les protéines extraites des cellules SKUT-1 et HCT116 sont respectivement utilisées comme contrôles positif et négatif.

La figure 32 nous démontre que la faible expression de la protéine exogène Mlh1 n'est pas suffisante pour rendre les cellules HCT116 complémentées résistantes à l'agent alkylant MNNG. Les clones numéro 4 et 5, sélectionnés avec 200 µg/ml d'hygromycine, ainsi que les clones p1 et 4 sélectionnés avec 1500 µg/ml d'hygromycine, sont environ 5 fois plus sensibles à 5 µM de MNNG que les cellules HCT116. Ces résultats représentent une complémentation partielle des cellules puisque lors de la complémentation des cellules HCT116 par le chromosome 3 entier qui porte le gène hMLH1, il a été observé que la restauration du système de MMR provoquait une augmentation de la sensibilité au MNNG de 30 et 200 fois respectivement pour des concentrations de 2,5 et 5 µM de MNNG (Koi et al., 1994).

Puisque le phénotype mutateur est caractéristique des cellules dont le système de MMR est non-fonctionnel, nous avons déterminé et comparé les taux de mutation ponctuelle du gène HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transférase) endogène dans les cellules HCT116 et HCT116 complémentées, par traitement des cellules avec la 6-thioguanine. La figure 33 nous indique que l'expression, même en faible quantité, de la protéine hMlh1 dans les cellules HCT116 contribue à diminuer le taux de mutation ponctuelle de ce gène de 2 à 15 fois. Cependant, des études sur la complémentation des cellules HCT15 et DLD1 avec le chromosome 2 entier, qui porte le gène hMSH2 dont ces cellules sont dépourvues,

Sensibilité au MNNG des cellules HCT116 complémentées avec pC4MLHwt

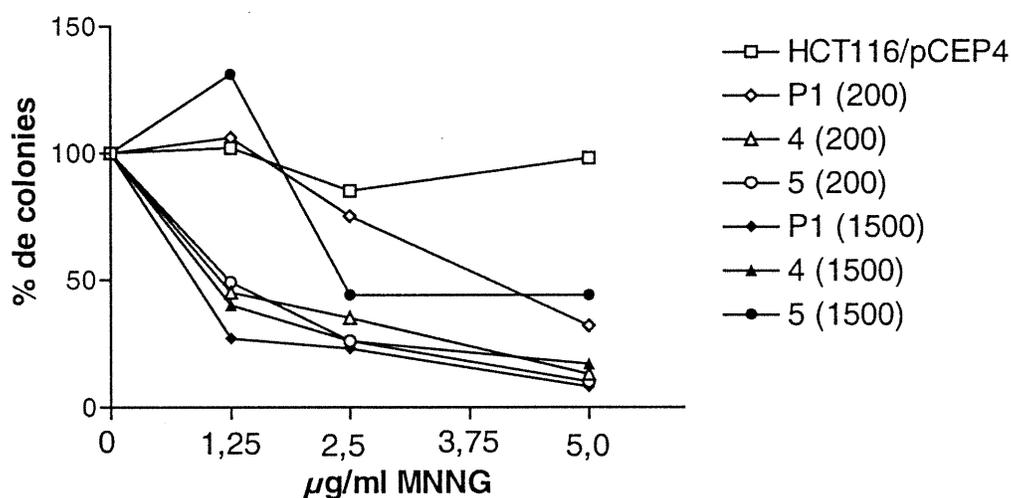


Figure 32:

Résistance à l'agent alkylant MNNG des cellules HCT116 transfectées avec pCEP4 ou pC4MLHwt (numéro 4, 5 et p1) et résistantes à 200 et 1500 µg/ml d'hygromycine. Le tableau représente le pourcentage de colonies formées dix jours après un traitement de 45 minutes avec des doses croissantes de MNNG. Le nombre de colonies obtenues avec les cellules non traitées représente 100% de colonies. Les résultats sont la moyenne d'une expérience faite en duplicata.

Fréquence de mutation du gène HPRT des cellules HCT116 complémentées avec pC4MLHwt

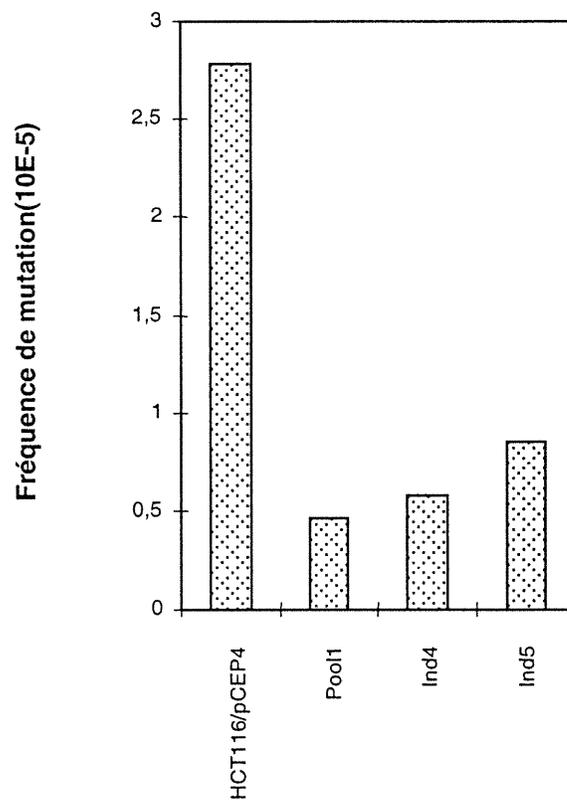


Figure 33:

La fréquence de mutation du gène HPRT a été déterminée pour les cellules HCT116 transfectées avec pCEP4 ou pC4MLHwt (numéro 4, 5 et p1) résistants à 200 μ g/ml d'hygromycine. Le nombre de colonies formées après 14 jours de traitement avec la 6-thio-guanine est utilisé pour calculer la fréquence de mutation du gène HPRT.

démontraient une diminution beaucoup plus importante du taux de mutation ponctuelle du gène HPRT, soit de l'ordre de 35 et 21 fois respectivement (Umar et al., 1997).

Étant donné que les résultats des tests de résistance au MNNG et du taux de mutation ponctuelle n'indiquent qu'une complémentation partielle de la lignée cellulaire HCT116 par le vecteur pC4MLHwt, nous avons modifié ce vecteur épisomique de même que le vecteur portant l'ADN complémentaire hMSH2 dans le but de réduire ou éliminer l'interférence transcriptionnelle négative qui pourrait affecter l'expression des gènes hMLH1 ou hMSH2 (Figure 34: pC9MLHpuro et pC9MSHpuro). La transfection des cellules et la quantification des protéines par Western a révélé que les nouveaux plasmides n'ont pas permis d'augmenter la quantité de protéines exogènes produites dans les cellules HCT116 et SKUT-1 comparativement au premier essai de complémentation (résultats non-illustrés).

Les cellules HCT116 et SKUT-1 complémentées avec les constructions illustrées aux figures 29 et 34, n'expriment pas suffisamment les protéines exogènes Mlh1 et Msh2 respectivement, en comparaison au niveau d'expression endogène de ces protéines. Puisque cette faible quantité de protéines exogènes ne semble restaurer que partiellement le système de MMR, du moins pour les HCT116, les essais de recombinaison n'ont pas été effectués dans ces cellules. Une restauration partielle du système de réparation comme nous l'observons dans les cellules HCT116

pC9MLHpuro et pC9MSHpuro

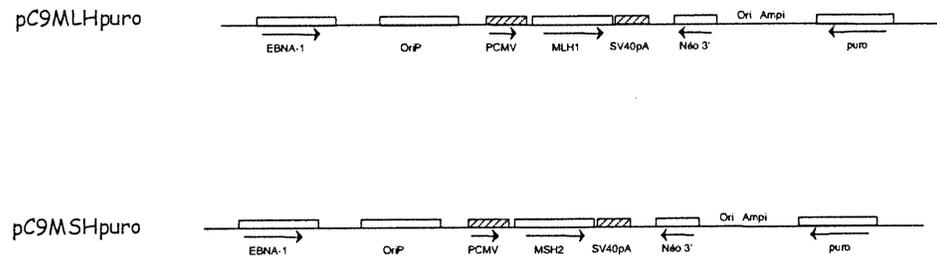


Figure 34:

pC9MLHpuro et pC9MSHpuro ont été construits en insérant respectivement l'ADN complémentaire des protéines Mlh1 et Msh2 humaines entre le promoteur P CMV et les séquences de polyadénylation de SV40 (SV40pA) du vecteur pCEP9 dont la partie 5' du marqueur de sélection néomycine a préalablement été excisée. Le marqueur de sélection puromycine (puro) a aussi été ajouté à ces constructions pour permettre leur sélection. L'antigène EBNA-1 du virus Epstein Barr et l'origine de répliation OriP permettent de maintenir les vecteurs sous forme épisomique dans les cellules humaines.

complémentées, pourrait fausser l'interprétation des résultats de recombinaison et ne permettrait pas de déterminer avec certitude le rôle du système de MMR sur l'inhibition de la recombinaison homologue entre les séquences d'ADN divergentes.

3.2.5 RÉPARATION DES CASSURES BICATÉNAIRES D'ADN PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE

La réparation des cassures bicaténaires d'ADN par recombinaison homologue est un mécanisme majeur dans le maintien de la stabilité du génome (Liang et al., 1998). D'ailleurs, des études faites chez les levures et les mammifères semblent démontrer qu'il y a peu ou pas d'effet de la divergence de séquence sur la réparation des cassures bicaténaires d'ADN par recombinaison homologue (Belmaaza et al., 1994; Priebe et al., 1994; Villemure et al., 1997). Une étude qui semble montrer que le système de MMR des mammifères interférerait avec la recombinaison induite par une cassure bicaténaire d'ADN lors du ciblage génétique (« *gene targeting* ») entre des séquences légèrement divergentes (deWind et al., 1995) est toutefois contradictoire avec un rôle de la réparation des cassures bicaténaires d'ADN par recombinaison homologue dans le maintien de la stabilité génomique. Cependant, les effets de la divergence de séquence et du système de MMR sur la recombinaison homologue spontanée et induite par une cassure bicaténaire d'ADN n'ont jamais été comparés dans le même système. Notre essai de reconstitution d'un intron dans le marqueur de sélection néomycine offre la possibilité d'effectuer cette comparaison avec le même système.

Pour déterminer les effets de la divergence de séquence et du système de MMR sur la réparation des cassures bicaténares d'ADN par recombinaison homologue, les plasmides pST100 et pST85 ont été linéarisés au site de restriction unique I-SceI présent au centre du LINE-1 de souris ou de rat (Figure 23, page 106), avant d'être introduits dans les cellules, tel que décrit précédemment. Avec les deux lignées cellulaires LMTK et SW480 dont le système de MMR est fonctionnel, nous avons obtenu que 15% de divergence de séquence entre les substrats de recombinaison plasmidiques de pST85 n'affecte pas la fréquence de réparation des cassures bicaténares d'ADN par recombinaison homologue qui est comparable à la fréquence obtenue avec les substrats de recombinaison identiques de pST100. En effectuant aussi cette étude dans les cellules humaines SKUT-1 et HCT116, dont le système de MMR est non-fonctionnel, nous avons observé que la fréquence de recombinaison induite par une cassure bicaténaire d'ADN n'est pas affectée par la divergence de séquence (Tableau IV).

Tableau IV: Effet de la divergence entre les séquences et du système de MMR sur la réparation des cassures bicaténares d'ADN par recombinaison homologue extrachromosomique

Cellules	Plasmides	G418 ^r	Puro ^r	Fréquence de recombinaison ^a	Ratio pST100:pST85
LMTK	pST100/SceI	173	82 ^b	210,9%	1,3: 1
	pST85/SceI	174	110 ^b	158,2%	
SW480	pST100/SceI	26	323	8%	1,1: 1
	pST85/SceI	36	404	9%	
SKUT-1	pST100/SceI	44	4072	1,1%	1,6: 1
	pST85/SceI	24	3292	0,7%	

^a La fréquence de recombinaison correspond au nombre de colonies G418^r divisé par le nombre de colonies Puro^r ou HAT^r.

^b Sélection HAT

Ces résultats nous indiquent que les effets de la divergence de séquence et du système de MMR sur la fréquence de recombinaison varient selon le processus de recombinaison homologue puisqu'ils entraînent une diminution de la fréquence de recombinaison homologue spontanée alors qu'ils n'ont aucun effet sur la fréquence de recombinaison homologue induite par une cassure bicaténaire d'ADN.

3.2.6 EFFET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE SUR LA STRUCTURE DES RECOMBINANTS INDUITS PAR UNE CASSURE BICATÉNAIRE D'ADN

Lors de nos études précédentes, nous avons démontré que la présence de divergence de séquence affecte la réparation des cassures bicaténaires d'ADN par recombinaison homologue entre un plasmide et une séquence chromosomique au niveau de l'étape de résolution des intermédiaires de recombinaison, en favorisant les événements de recombinaison de type imprécis (Belmaaza et al., 1994; Villemure et al., 1997) c'est à dire dont la séquence de départ n'est pas parfaitement reconstituée. Puisqu'avec l'essai actuel, la divergence entre les séquences et la réparation des appariements erronés de bases n'interfèrent pas avec la fréquence de recombinaison homologue induite par une cassure bicaténaire d'ADN, nous avons vérifié la structure des recombinants pour déterminer si la divergence de séquence affecte la nature des événements de recombinaison au niveau extrachromosomique.

Nous avons analysé par PCR la structure des recombinants obtenus avec les deux plasmides, pST85 et pST100, dans les cellules SW480 et SKUT-1 dont le système de MMR est respectivement fonctionnel et non-fonctionnel. Avec notre

essai, la reconstitution du gène néomycine par recombinaison implique une étape d'initiation de la recombinaison qui résulte en une jonction homologue précise ou parfaitement reconstituée, et une étape de résolution qui peut engendrer soit une jonction précise ou une jonction imprécise de recombinaison. Ces deux jonctions sont formées de part et d'autre de l'exon 5' du gène néomycine, soit respectivement dans l'intron et en dehors des séquences codantes du gène néomycine. Puisqu'avec l'essai plasmidique, la recombinaison homologue précède l'intégration illégitime du vecteur dans le génome, il est possible que lors de l'étape d'intégration, il se produise une interruption ou la perte de certaines séquences plasmidiques flanquant le gène néomycine reconstitué. Ceci implique que la jonction des événements de recombinaison qui se retrouve en dehors des séquences codantes du gène néomycine est susceptible d'être perdue lors de l'intégration alors que la jonction de recombinaison qui se retrouve dans l'intron du gène néomycine, sera toujours intacte pour les recombinants sélectionnés. L'analyse par PCR des événements de recombinaison portera donc uniquement sur la jonction de recombinaison qui se retrouve dans l'intron du gène néomycine et qui demeure toujours intacte suite à l'intégration du vecteur recombiné.

Ainsi l'analyse de la jonction de recombinaison intronique précise des recombinants de type précis permettra de classer l'événement comme étant précis. Par contre, étant donné que les événements de recombinaison peuvent être initiés aussi efficacement par les deux extrémités de la cassure bicaténaire d'ADN (Villemure et al., 1997), chacune des jonctions des événements de recombinaison

imprécis, jonctions homologues créées lors de l'initiation et illégitimes lors de la résolution, ont des chances égales de se retrouver dans l'intron du gène néomycine. Ceci implique qu'en analysant uniquement la jonction de recombinaison qui est dans l'intron du gène néomycine, nous obtiendrons des jonctions précises pour tous les événements de recombinaison imprécis dont la jonction illégitime se retrouve en dehors du gène néomycine. Ainsi, seulement 50% des recombinants de type imprécis (ceux dont la jonction illégitime se retrouve dans l'intron) seront détectés comme étant imprécis alors que les 50% restants (dont la jonction illégitime est située en dehors du gène néomycine) seront détectés comme étant des recombinants de type précis de la même façon que tous les recombinants de type précis. Afin d'éviter de considérer les événements imprécis dont la jonction illégitime ne se retrouve pas dans l'intron comme étant précis, nous considérerons que le nombre de recombinants imprécis est en fait le double du nombre de jonctions imprécises analysées et que le nombre de recombinants précis correspond à la différence entre le nombre total de recombinants analysés et le nombre de recombinants imprécis déterminé.

Les recombinants ont été analysés par la méthode de PCR tel que décrit à la section 2,6. Les amorces utilisées (néo952⁺ et néo1300⁻) sont situées dans chaque exon du gène néomycine (Figure 27, page 121) et permettent d'amplifier un fragment d'ADN de 1,3 kpb, incluant l'intron. Dans le cas des jonctions introniques imprécises, un fragment de poids moléculaire inférieur ou supérieur à 1,3 kpb pourra être détecté, selon que la recombinaison imprécise aura provoqué la perte ou

l'acquisition de séquences d'ADN dans la séquence LINE de l'intron (voir « *one-sided invasion* », section 1.1.2.1.4, page 19)

Le tableau V indique que la proportion de recombinants imprécis est de 44% entre les séquences identiques de pST100 et augmente à 96% en présence de divergence de séquence avec pST85 dans les cellules SW480 qui ont un système de MMR fonctionnel. Les proportions de recombinants précis et imprécis obtenues en absence et en présence de divergence de séquences dans les cellules SW480, sont comparables aux proportions obtenues lors de nos études précédentes avec l'essai plasmide/chromosome (Belmaaza et al., 1994; Villemure et al., 1997).

Ces études avaient mené à l'hypothèse que l'augmentation de proportion de recombinants imprécis en présence de divergence entre les séquences pouvait être due à l'action du système de MMR qui reconnaît les appariements erronés de bases au niveau de l'intermédiaire d'ADN bicaténaire formé durant la recombinaison. Par la suite des événements de réparation qui introduisent des coupures ou provoquent la dégradation de l'ADN seraient initiés et favoriseraient la résolution de la recombinaison en événements imprécis (Belmaaza et al., 1994; Villemuré et al., 1997). Si cette hypothèse est vraie, alors les proportions de recombinants précis et imprécis obtenues avec pST85 en absence de réparation des appariements erronés de bases devraient être comparables à celles obtenues avec pST100 dans les cellules qui font la réparation des appariements erronés de bases. Selon cette hypothèse, les proportions de recombinants de type précis et imprécis entre les séquences

identiques du plasmide pST100, ne devraient pas être affectées par le statut du système de MMR.

Tableau V: Effet de la divergence entre les séquences et du système de MMR sur la structure des recombinants suite à la réparation de cassures bicaténares d'ADN.

Cellules	Plasmides	Structure des recombinants			
		Précis	Imprécis	Précis*	Imprécis*
SW480	pST100/SceI	25	7	18 (66%)	14 (44%)
	pST85/SceI	14	13	1 (4%)	26 (96%)
SKUT-1	pST100/SceI	15	16	0 (0%)	31 (100%)
	pST85/SceI	4	23	0 (0%)	27 (100%)

* Résultats corrigés pour tenir compte que l'analyse porte sur une seule des deux jonctions des événements de recombinaison.
Statistiquement significatif ($\alpha < \text{ou} = \text{à } 0,05$)

3.2.7 EFFET DU SYSTÈME DE MMR SUR LA STRUCTURE DES RECOMBINANTS INDUITS PAR RÉPARATION DES CASSURES BICATÉNAIRES D'ADN.

Pour vérifier si l'augmentation de la proportion de recombinants de type imprécis obtenus avec les substrats de recombinaison divergents résulte de l'action du système de MMR qui agirait sur les intermédiaires d'ADN bicaténaire formés durant la recombinaison (Belmaaza et al., 1994; Villemure et al., 1997), nous avons analysé la structure des recombinants provenant des cellules SKUT-1 dont le système de MMR est non-fonctionnel.

Les proportions de recombinants précis et imprécis obtenus avec les vecteurs pST100 et pST85 dans la lignée cellulaire SKUT-1 sont effectivement comparables entre elles (Tableau V 100% de recombinants imprécis). Cependant, contrairement aux résultats attendus, ces proportions diffèrent des proportions de recombinants précis et imprécis obtenus avec le plasmide pST100 dans les cellules SW480 (56% précis, 44% imprécis). En fait, les substrats de recombinaison identiques de pST100 et divergents de pST85 ne produisent que des recombinants de type imprécis dans la lignée cellulaire SKUT-1 de façon similaire aux recombinants obtenus avec le plasmide pST85 dans les cellules SW480. Ces résultats semblent être en contradiction avec l'hypothèse qui implique le système de MMR dans la formation des recombinants imprécis et semble plutôt suggérer un rôle de la protéine Msh2 dans le processus permettant d'obtenir des événements de recombinaison de type précis. La protéine Msh2, indépendamment de son rôle de réparation des appariements erronés de bases, pourrait être impliquée dans la stabilisation des

intermédiaires de recombinaison pour permettre la résolution en recombinants précis. Les résultats obtenus avec les cellules SKUT-1 n'écartent cependant pas la possibilité que le système de MMR puisse être impliqué dans la formation des recombinants de type imprécis entre les séquences divergentes. Effectivement, si la protéine Msh2 est impliquée dans la formation des recombinants de type précis, son absence dans les cellules SKUT-1 utilisées ici, empêchera de détecter l'effet du système de MMR sur la formation des recombinants de type imprécis, s'il en est un.

La suite de cette étude qui est présentement en cours consiste à utiliser la lignée cellulaire HCT116 dont le système de MMR est non-fonctionnel mais qui exprime la protéine Msh2. En utilisant les cellules HCT116, il sera possible de vérifier quelle est l'implication du système de MMR dans la formation des recombinants de type imprécis entre les séquences divergentes. L'utilisation des cellules HCT116 permettra aussi de déterminer le rôle de la protéine Msh2, indépendamment ou non du système de MMR, dans la formation des recombinants de type précis. Si aucun recombinant de type précis n'est obtenu avec les deux plasmides pST100 et pST85 dans les cellules HCT116, comme c'est le cas dans les cellules SKUT-1, on pourra conclure que le système de MMR fonctionnel est nécessaire pour la formation de ce type de recombinants. Par contre si des recombinants de type précis étaient détectés avec pST100 dans les cellules HCT116, cela impliquerait que la protéine Msh2 possède un rôle dans la formation de ce type d'événements de recombinaison. Et si des recombinants de type précis étaient obtenus dans les cellules HCT116 entre les séquences divergentes de pST85, cela

suggererait que le système de MMR est impliqué dans la formation des recombinants de type imprécis entre les séquences divergentes de pST85.

Les résultats présentés dans le tableau V montrent aussi que les deux extrémités de la cassure bicaténaire d'ADN du vecteur pST85 n'ont pas la même probabilité d'initier un événement de recombinaison. La proportion élevée de 85% de jonctions imprécises du côté de l'intron (avant correction des résultats) avec le plasmide pST85 dans les cellules SKUT-1, suggère que l'extrémité provenant de la partie 5' du substrat de recombinaison LINE de rat a été utilisé plus fréquemment pour initier l'événement de recombinaison que l'extrémité provenant de la partie 3'. Il est possible que cette préférence soit due au niveau de divergence entre les substrats de recombinaison LINE de souris et de rat, qui est plus élevé dans la partie 3' que dans la partie 5'. En effet, les 300 pb situées à l'extrémité 3' du LINE de rat, L1Rn3, ne partagent que 74% d'homologie avec la séquence de souris L1Md-A2 alors que le reste des séquences ont une homologie de séquences de 85%. Pour que la divergence de séquence plus élevée dans cette portion des substrats de recombinaison affecte la fréquence d'initiation de la recombinaison, il faut *à priori* que les extrémités de la cassure bicaténaire d'ADN subissent suffisamment de dégradation pour exposer cette portion de séquences. Il a déjà été démontré chez la levure *S. cerevisiae* que la protéine Msh2, en association avec Msh3, s'associe *in vivo* avec l'ADN contenant des cassures bicaténaires d'ADN avant que les intermédiaires de recombinaison ne soient formés (Evans et al., 2000). Il serait donc possible que la protéine Msh2 soit impliquée dans la protection des extrémités

des cassures bicaténares d'ADN contre la dégradation. Donc en absence de la protéine Msh2 il pourrait y avoir beaucoup plus de dégradation, ce qui exposerait la portion d'ADN de l'extrémité 3' qui est plus divergente. Cette portion d'ADN pourrait être trop divergente pour initier l'initiation de la recombinaison aussi efficacement que l'autre extrémité et être bien reconnues par les enzymes de recombinaison (Datta et al., 1996). Ceci expliquerait le biais en faveur de l'autre extrémité plus homologue pour initier les événements de recombinaison.

Pour vérifier l'implication possible de la protéine Msh2 dans la protection des extrémités d'ADN contre la dégradation de l'ADN, nous avons transfecté le vecteur pSV2Néo linéarisé dans les cellules SW480 et SKUT-1. Les plasmides ont été récupérés 48 heures après la transfection puis utilisés pour transformer des bactéries, afin de comparer l'état de leur dégradation. Nous avons obtenu que tous les plasmides récupérés des deux lignées cellulaires n'avaient subi que très peu ou pas de dégradation de leurs extrémités. Ceci suggère que l'hypothèse de l'implication de la protéine Msh2 dans la protection des extrémités des cassures bicaténares d'ADN contre la dégradation ne s'applique pas ou bien que les extrémités du plasmide pSV2Néo qui ne sont pas impliquées dans un intermédiaire de recombinaison, ont été liées assez rapidement pour ne pas subir de dégradation de sorte que l'effet de la protéine Msh2 n'est pas détectable avec cette stratégie.

Une deuxième façon d'expliquer nos résultats avec le plasmide pST85, où 85% des jonctions illégitimes se retrouvent du côté de l'intron dans les cellules

SKUT-1, est d'évoquer la présence d'une extrémité non-homologue, longue de 188 pb, à une des extrémités de la cassure bicaténaire d'ADN. Cette séquence non-homologue est créée suite à la coupure par I-SceI dans la séquence LINE de rat dont le site ne correspond pas exactement au site d'insertion de l'exon néo5' dans la séquence LINE de souris. Il est donc possible que suite à l'appariement homologue de cette extrémité avec la séquences LINE de souris, l'extrémité 3' qui n'est pas appariée, forme une extrémité monocaténaire qui doit être éliminée pour permettre l'initiation de la synthèse d'ADN. Chez la levure, il a été montré que la protéine Msh2 participe avec les protéines du système de NER, Rad1 et Rad10, à l'enlèvement de telles extrémités 3' monocaténaires non-homologues résultant de l'appariement d'une région homologue située plus en amont de la cassure (Pâques et Haber, 1997; Sugawara et al., 1997). Il est donc possible que chez les mammifères aussi la protéine Msh2 possède ce rôle et que son absence diminue l'efficacité d'excision de cette extrémité. Si l'extrémité monocaténaire n'est pas excisée, la synthèse d'ADN ne pourra pas être amorcée par cette extrémité de la cassure qui sera plutôt impliquée dans la résolution de l'événement de recombinaison.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Nous avons mis au point un nouvel essai de recombinaison afin de déterminer l'effet de la divergence de séquence et du système de MMR (mismatch repair: MMR) sur la recombinaison homologue dans les cellules de mammifères. Contrairement aux essais de recombinaison normalement utilisés, notre essai ne fait pas intervenir des séquences de marqueur de sélection comme substrats de recombinaison et ne nécessite donc pas la reconstitution exacte des séquences impliquées dans le processus de recombinaison pour que l'événement soit détecté. L'essai est basé sur la reconstitution d'un intron constitué de séquence répétitives LINE. La recombinaison homologue entre ces séquences LINE permet d'aligner les deux exons artificiels du marqueur de sélection néomycine, ce qui rend le gène néomycine fonctionnel et permet l'isolement des événements de recombinaison.

Même si la recombinaison homologue entraînait de petits réarrangements, comme des délétions ou des insertions de séquences, dans les substrats de recombinaison LINE, l'expression du gène néomycine n'en serait pas affectée puisque les séquences LINE sont localisés de part et d'autre du gène néomycine reconstitué ou à l'intérieur de son intron. Ainsi l'essai permet de récupérer les événements de recombinaison précis et imprécis et de déterminer quelles sont les étapes de recombinaison qui sont affectées par la divergence de séquence et le système de MMR.

Deux vecteurs ont été construits, afin de déterminer l'effet de la divergence de séquence et du système de MMR sur la recombinaison homologue dans les cellules de mammifères. Les deux vecteurs diffèrent uniquement au niveau de leurs substrats de recombinaison qui sont soit 100% homologues pour le plasmide pST100 qui contient deux fragments identiques de la séquence LINE de souris L1Md-A2 ou 85% homologues pour le plasmide pST85 qui contient un fragment de la séquence L1Md-A2 ainsi que le fragment correspondant provenant de la séquence LINE de rat L1Rn3 (Figure 23, section 3.1.4, page 104). Nous avons choisi un degré de divergence de séquence de 15%, afin de comparer nos résultats avec d'autres études de recombinaison qui ont utilisé des niveaux de divergence similaires chez la bactérie, la levure et les mammifères (Modrich et Lahue, 1996). Initialement, la recombinaison entre des séquences bactériennes non-identiques a été étudiée par la conjugaison entre les génomes des bactéries *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* qui ont des divergences de séquences de 18% (Rayssiguier et al., 1989). Les essais sélectifs utilisés chez les mammifères utilisaient pour leur part les seules séquences de marqueurs de sélection possédant de la divergence de séquence, soit les gènes de la thymidine kinase de HSV-1 et HSV-2 qui partagent 18% de divergence de séquence (Waldman et Liskay, 1987 ; 1988).

4.1 EFFET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE SUR LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE EXTRACHROMOSOMIQUE SPONTANÉE

Les vecteurs pST100 et pST85 ont été introduits de façon indépendante et en parallèle dans deux lignées cellulaires de mammifères, murine (LMTK) et

humaine (SW480), dont le système de MMR est fonctionnel. La recombinaison homologue extrachromosomique entre les séquences LINE portées par le même vecteur (intraplasmidique) ou par deux molécules d'un même vecteur (interplasmidique) permet d'aligner les deux exons du gène néomycine et de reconstituer son intron avant que le vecteur ne s'intègre dans le génome de la cellule.

Nous avons obtenu qu'une divergence de séquence de 15% provoque une diminution de 5 à 6 fois de la fréquence de recombinaison spontanée dans les cellules LMTK et SW480 respectivement, par rapport aux fréquences obtenues entre les séquences identiques pST100 (Tableau III, section 3.2.2, page 115). De plus, la diminution de la fréquence de recombinaison spontanée que nous observons avec notre essai est comparable à celle observée par Waldman et Liskay (1988) dans les cellules LMTK, avec un essai de recombinaison sélectif extrachromosomique, entre des séquences 19% divergentes, mais nos résultats diffèrent pour la recombinaison induite par cassure bicaténaire d'ADN (voir plus loin).

On observe aussi avec les cellules de souris LMTK, que la fréquence de recombinaison calculée pour le plasmide pST100 (92,2%) est considérablement plus élevée que les fréquences obtenues avec le même plasmide dans les cellules humaines (6,08%, 1,30% et 1,10% avec les SW480, SKUT-1 et HCT116 respectivement; Tableau III, section 3.2.2, page 114). En plus de l'explication décrite dans les résultats (Section 3.2.2) où la cause possible de cette variation

pourrait être due à la façon de calculer les fréquences de recombinaison, soit en divisant le nombre de colonies résistantes à la sélection G418 obtenues par le nombre de colonies résistantes à la sélection HAT pour les cellules murines ou résistantes à la sélection puromycine pour les cellules humaines, plusieurs autres possibilités pourraient expliquer une telle différence entre les fréquences de recombinaison. D'abord, il est possible que le potentiel de recombinaison soit une propriété intrinsèque à chaque lignée cellulaire qui se manifesterait par une capacité plus ou moins grande à effectuer des événements de recombinaison. Selon cette hypothèse, le potentiel de recombinaison des cellules LMTK serait beaucoup plus élevé que celui des lignées cellulaires humaines utilisées dans notre étude. Cependant, les potentiels de recombinaison des lignées cellulaires humaines qui ont une origine différente (lignées colorectales SW480 ou HCT116 et cellules SKUT-1 provenant de l'utérus), sont très similaires.

Une deuxième possibilité qui expliquerait la variation des fréquences de recombinaison entre les cellules murines et humaines, implique un effet de la nature des séquences qui constituent l'intron du gène néomycine et qui pourraient affecter son épissage dans certaines cellules. Il est possible que la présence de séquences LINE de souris ou de rat dans l'intron agisse favorablement sur l'épissage de l'intron du gène néomycine, spécifiquement dans les cellules de souris, par un mécanisme inconnu. Un tel mécanisme pourrait impliquer la reconnaissance de l'homologie entre les ARN nucléaires des séquences LINE endogènes et celui de l'intron. Cette interaction homologue, spécifique aux cellules de souris où les

séquences LINE de l'intron et endogènes partagent le plus d'homologie, entraînerait une stabilisation de l'ARN du gène néomycine favorisant son épissage et ainsi son expression, ce qui permettrait de détecter plus d'événements de recombinaison et de calculer une fréquence de recombinaison plus élevée. Cependant, aucun effet de ce genre n'a été rapporté dans la littérature et cette hypothèse va à l'encontre de l'inhibition de l'expression des gènes par les ARN antisens. Il serait tout de même possible de vérifier si la nature des séquences constituant l'intron du gène néomycine affecte différemment son expression dans les cellules humaines et murines en transfectant ces cellules avec des vecteurs contenant le gène néomycine dont l'intron serait constitué soit de séquences LINE de souris, d'humain ou de séquences autres que des séquences LINE.

Quelle que soit la cause exacte de la variation des fréquences de recombinaison entre les lignées cellulaires, l'interprétation de nos résultats ne devrait pas en être affectée puisque les vecteurs pST100 et pST85 ont tous les deux été soumis à cet effet. Alors, pour éviter d'introduire un biais dans l'analyse de nos résultats qui pourrait provenir de différences entre les lignées cellulaires autres que celles affectant le système de MMR, seules les fréquences de recombinaison provenant d'une même lignée cellulaire ont été comparées entre elles. Ce sont plutôt les écarts entre les fréquences calculées en présence ou non de divergence de séquences qui ont été comparés entre les différentes lignées cellulaires.

4.2 EFFET DU SYSTÈME DE MMR SUR LA RECOMBINAISON EXTRACHROMOSOMIQUE SPONTANÉE ENTRE DES SÉQUENCES 85% HOMOLOGUES

Pour déterminer si l'écart entre les fréquences de recombinaison obtenues pour pST100 et pST85 avec les cellules LMTK et SW480 est dû au système de MMR, nous avons comparé les fréquences de recombinaison des deux vecteurs, dans les lignées cellulaires humaines SKUT-1 et HCT116 qui n'expriment pas Msh2 et Mlh1 respectivement (Figure 26, section 3.2.2, page 116) et dont le système de MMR est non-fonctionnel (Koi et al., 1994; Risinger et al., 1995; Richards et al., 1997). Dans ces cellules, la fréquence de recombinaison obtenue avec pST85 est diminuée de seulement 2 et 3 fois comparativement à la fréquence obtenue avec pST100, et ces diminutions sont statistiquement moins importantes que la diminution de 5 à 6 fois obtenue dans les cellules LMTK et les SW480 dont le système de MMR est fonctionnel (« *Odds ratio* »: $\alpha \ll 0,005$; Tableau III, section 3.2.2, page 114). L'effet moins sévère de la divergence de séquence sur la fréquence de recombinaison homologue dans les cellules SKUT-1 et HCT116 comparativement aux cellules LMTK et SW480, suggère que le système de MMR des mammifères exercerait un effet inhibiteur sur la recombinaison entre des séquences divergentes tout comme les systèmes de MMR des bactéries et des levures (Modrich et Lahue, 1996).

Les cellules SKUT-1 et HCT116 que nous utilisons et dont le système de MMR est non-fonctionnel, sont de phénotype mutateur ce qui implique qu'elles

accumulent des mutations suite à un grand nombre de divisions. Il est donc possible que la faible diminution (2 à 3 fois) de la fréquence de recombinaison observée en présence de divergence de séquence dans ces cellules et que nous attribuons à une défectuosité du système de MMR soit en fait due à l'introduction de mutations dans d'autres gènes. De telles mutations pourraient affecter soit le processus de recombinaison de façon générale ou plus spécifiquement la recombinaison entre des séquences divergentes. Dans le premier cas, l'effet des mutations sera le même sur la recombinaison impliquant des séquences identiques ou divergentes et n'affectera pas nos conclusions puisque les fréquences de recombinaison entre les séquences identiques et divergentes, sont comparées dans les mêmes cellules plutôt qu'entre les lignées cellulaires. Le deuxième type de mutation affecterait des protéines qui doivent avoir une fonction de reconnaissance des appariements erronés de bases. Jusqu'à maintenant, la seule protéine des mammifères connue possédant une telle fonction, à part Msh2, est le suppresseur de tumeur p53. Cette protéine peut fixer les appariements erronés de bases dans les intermédiaires d'ADN bicaténaire (Dudenhöffer et al., 1998; Lee et al., 1995) et semble interférer avec la recombinaison entre des séquences non-identiques (Dudenhöffer et al., 1998). Toutefois, nos résultats indiquent que cette protéine ne semble pas interférer avec nos conclusions. D'abord, la diminution de 6 fois de la fréquence de recombinaison observée entre les séquences divergentes dans les cellules SW480 n'est attribuable qu'au système de MMR étant donné que le gène p53 est muté dans ces cellules (Cottu et al., 1996). Deuxièmement, malgré l'expression normale de p53 dans les cellules HCT116 (Gupta et al., 1997), la diminution de la fréquence de

recombinaison entre les séquences divergentes n'est pas plus importante que dans les cellules SW480 où p53 est muté. Ces observations indiquent que les diminutions de fréquences de recombinaison qui sont observées en présence de substrats de recombinaison divergents ne sont pas dues à la mutation d'autres gènes dans les cellules ayant un phénotype mutateur mais bien au système de MMR.

4.3 RÔLE DE MSH2 DANS L'INHIBITION DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE SPONTANÉE ENTRE DES SÉQUENCES DIVERGENTES

Chez la bactérie, il a été montré que les effets d'inhibition de la recombinaison par MutS ou MutL entre des séquences non-identiques sont équivalents (Rayssiguier et al., 1989) alors que chez la levure l'effet de Msh2 est plus prononcé que celui de Mlh1 (Nicholson et al., 2000). Nos résultats sont consistants avec les observations faites chez la levure puisque nous observons que la fréquence de recombinaison entre les séquences 15% divergentes de pST85 est plus diminuée dans les cellules HCT116 (Mlh1 déficientes, diminution de 3,3 fois) que dans les cellules SKUT-1 (Msh2 déficientes, diminution de 1,9 fois; Tableau III, section 3.2.2, page 114). Cette différence, bien qu'elle ne soit pas statistiquement significative ($\alpha=0,086$), pourrait être attribuable à la présence de la protéine hMsh2 dont l'expression est normale dans les cellules HCT116, contrairement aux cellules SKUT-1 qui ne l'expriment pas du tout (confirmé par Western: Figure 26, section 3.2.2, page 116) (Richards et al., 1997; Risinger et al., 1995). La protéine Msh2 des mammifères pourrait avoir conservé les mêmes fonctions que la protéine

bactérienne MutS (Worth et al., 1994) dont elle est l'homologue. Lors d'études *in vitro* il a été montré que la protéine MutS peut à elle seule inhiber l'échange de brins entre des séquences divergentes, et que cette inhibition est augmentée en présence de la protéine MutL (Worth et al., 1994). De plus, il a été montré qu'en présence d'appariements erronés de bases, la protéine de levure Msh2, homologue de MutS, peut bloquer la migration des branches durant la recombinaison méiotique (Alani et al., 1994; Nicholson et al., 2000). Il est donc possible que la protéine hMsh2 exprimée dans les cellules HCT116 interfère avec la recombinaison en provoquant le rejet de l'intermédiaire d'ADN bicaténaire formé entre des séquences divergentes contribuant ainsi à diminuer la fréquence de recombinaison entre les séquences divergentes de pST85.

4.4 EFFET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE SUR LE PROCESSUS DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE SPONTANÉE

Malgré l'absence d'un système de MMR fonctionnel dans les cellules SKUT-1 et HCT116 (Koi et al., 1994; Richards et al., 1997; Risinger et al., 1995), les fréquences de recombinaison entre les séquences divergentes de 15% du plasmide pST85 demeurent 2 à 3 fois inférieures aux fréquences obtenues entre les séquences identiques de pST100. Ces résultats semblent révéler un effet inhibiteur de la divergence de séquence, indépendamment du système de MMR, sur le processus de recombinaison homologue. Il est possible que les séquences de recombinaison de pST85, (85% d'homologie) soient trop divergentes pour permettre à la machinerie de recombinaison des cellules de mammifères d'initier l'échange de brins entre elles

aussi efficacement qu'entre des séquences identiques. Dans ce cas, la diminution de la fréquence de recombinaison observée entre les séquences divergentes de 15%, en absence d'un système de MMR fonctionnel, refléterait la formation d'un moins grand nombre d'intermédiaires de recombinaison qu'entre les séquences identiques de pST100. Des études précédentes faites chez la levure et la bactérie et utilisant respectivement des séquences 77% et 86% homologues comparativement à des séquences identiques avaient aussi mené à la conclusion que la divergence de séquence ainsi que le système de MMR limitaient la recombinaison entre des séquences non-identiques (Datta et al., 1996; Rayssiguier et al., 1989; Shen et Huang, 1989) et que la surexpression de la protéine RecA chez la bactérie éliminerait l'effet de la divergence (Matic et al., 1995).

Il est aussi possible que l'écart des fréquences de recombinaison que nous observons en absence de système de MMR fonctionnel soit dû à un effet de la protéine p53 qui peut fixer les appariements erronés de bases et pourrait interférer avec la recombinaison entre des séquences non-identiques (Dudenhöffer et al., 1998). L'expression de la protéine p53 est normale dans les cellules HCT116 (Gupta et al., 1997) mais son expression dans les cellules SKUT-1 n'a pas été déterminée.

4.5 EFFET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE ET DU SYSTÈME DE MMR SUR LA RÉPARATION DES CASSURES BICATÉNAIRES D'ADN PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE.

Nos résultats indiquent qu'en présence ou en absence d'un système de MMR fonctionnel, 15% de divergence de séquence ne diminue pas la fréquence de recombinaison homologue induite par une cassure bicaténaire d'ADN (Tableau IV, section 3.2.5, page 135). Cependant, d'autres études ont montré que la divergence de séquence peut entraîner une importante diminution de la fréquence de recombinaison homologue lors de la réparation des cassures bicaténaires d'ADN extrachromosomique (Waldman et Liskay, 1987) ou de ciblage de gène (« *Gene targeting* », deWind et al., 1995) dans des cellules dont le système de MMR est fonctionnel. La conjugaison chez la bactérie est un autre exemple de recombinaison épisomique induite par des cassures bicaténaires d'ADN dont la fréquence peut diminuer jusqu'à 1000 fois entre des séquences 15% divergentes, en présence d'un système de MMR fonctionnel (Rayssiguier et al., 1989).

La cause de ces différences d'effets de la divergence de séquence sur la réparation des cassures bicaténaires d'ADN par recombinaison homologue n'est pas connue mais pourrait être due à la nature des essais de recombinaison qui diffèrent entre les études. Certains essais ne détectent que les produits de recombinaison fonctionnels (précis) alors que d'autres (Belmaaza et al., 1994; Villemure et al., 1997; présente étude) récupèrent les événements précis de même que les recombinants réarrangés. Une autre explication pourrait être que dans certains

essais, la cassure bicaténaire d'ADN peut être réparée par un mécanisme qui ne requiert que l'invasion par une extrémité 3' qui amorce la réplication de l'ADN (Adair et al., 1998; Belmaaza et al., 1990; 1994; Belmaaza et Chartrand, 1994; Priebe et al., 1994; Villemure et al., 1997; figure 35a). Alors que le ciblage de gène et la conjugaison nécessite en plus de l'invasion, la formation et la migration d'une jonction de Holliday et sa résolution en enjambement (Figure 35b). Ces étapes semblent être très sensibles à la divergence de séquence et aux protéines du système de MMR (Alani et al., 1994; DasGupta et Radding, 1982; Panuytin et Hsieh, 1993; Worth et al., 1994) tandis que la recombinaison associée à la réplication semble être un mécanisme très efficace pour la réparation des cassures bicaténaires d'ADN entre des séquences divergentes (Belmaaza et al., 1990; 1994; Priebe et al., 1994; Villemure et al., 1997)

4.6 MÉCANISME DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE LORS DE LA RÉPARATION DES CASSURES BICATÉNAIRES D'ADN

L'absence d'effet de la divergence de séquence sur la recombinaison homologue induite par une cassure bicaténaire d'ADN pourrait s'expliquer par une initiation de la recombinaison par un intermédiaire d'ADN bicaténaire très court dont la stabilité serait assurée par une amorce rapide de la synthèse d'ADN. Dans ce cas, l'intermédiaire d'ADN bicaténaire serait suffisamment court pour n'offrir qu'une très faible probabilité de créer plusieurs appariements de bases erronés adjacents pouvant être reconnus et corrigés par le système de MMR.

*Modèle de réparation des cassures bicaténaire
d'ADN par recombinaison homologue*

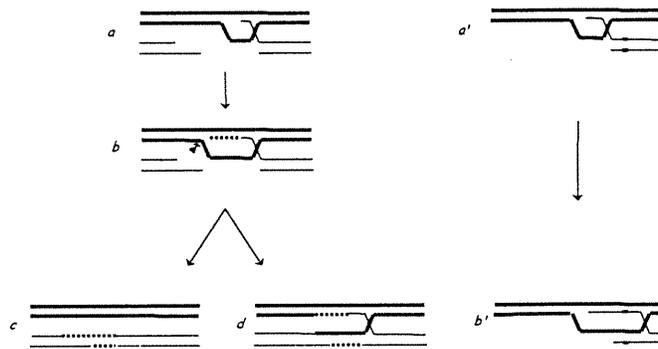


Figure 35: (Légende page suivante)

Figure 35 : Modèle de réparation des cassures bicaténaire d'ADN par recombinaison homologue impliquant ou non une jonction de Holliday

Les étapes a, b, c et d représentent la réparation des cassures bicaténaire d'ADN quand les deux extrémités sont disponibles pour la recombinaison. L'une ou l'autre des extrémités 3' générées suite à l'introduction d'une cassure bicaténaire d'ADN, peut participer à l'étape d'invasion de la molécule d'ADN bicaténaire homologue, déplacer une boucle d'ADN monocaténaire et amorcer la synthèse d'ADN (a et b). L'intermédiaire de recombinaison (b) peut être résolu de deux façons. La résolution peut se produire par un déroulement du brin nouvellement synthétisé suivi de son appariement avec l'extrémité non-invasive de la cassure bicaténaire d'ADN (c). La résolution peut aussi se produire par l'introduction d'une coupure à une extrémité de la boucle d'ADN monocaténaire (flèche en b) et l'appariement subséquent de l'extrémité de la boucle avec l'extrémité non-invasive de la cassure bicaténaire d'ADN. La synthèse d'ADN et l'union des extrémités généreront une jonction de Holliday pouvant migrer dans les deux directions (d). Les étapes a' et b' illustrent la recombinaison quand une seule des deux extrémités de la cassure bicaténaire d'ADN est disponible (i.e. conjugaison chez la bactérie). Chaque brin monocaténaire, 5' ou 3', peut envahir la molécule d'ADN bicaténaire homologue (a'). Dans les deux cas, les marqueurs (boîtes noires en a' et b') peuvent être transférés vers la molécule d'ADN bicaténaire receveuse intacte suite à la formation et la migration d'une jonction de Holliday (b'). Les types de recombinaison qui impliquent la formation d'une jonction de Holliday (d et b') sont plus affectés par la divergence de séquence et les enzyme de MMR que b ou c (Voir texte).

Ainsi, il ne pourrait pas y avoir d'interruption de l'événement de recombinaison provoqués par les cassures bicaténares d'ADN que peut générer le chevauchement de plusieurs événements de réparation (Radman, 1988).

Cette hypothèse va toutefois à l'encontre de la notion de la longueur minimale d'homologie ininterrompue qui serait nécessaire pour que la recombinaison homologe se fasse efficacement (« *MEPS value* »), valeur qui a été évaluée à environ 200 pb pour la recombinaison intermoléculaire chez les mammifères (Liskay et al., 1987). Dans le cas présent, les séquences LINE de souris et de rat utilisées avec le plasmide pST85 partagent 85% d'homologie de séquences sauf pour les 300 pb situées en 3' de ces séquences, où l'homologie est de 74%. Dans la région de 85% d'homologie, les appariements erronés de bases sont uniformément distribués de sorte que les sections d'homologie non-interrompue sont inférieures ou égales à 44 pb. Malgré l'absence de région d'homologie plus longue, la recombinaison homologe se fait de façon efficace et en présence de cassures bicaténares d'ADN, les fréquences de recombinaison que nous avons obtenues entre les séquences divergentes du plasmide pST85 sont très similaires à celles obtenues avec les substrats identiques de pST100 qui partagent deux régions d'homologie non-interrompue de 884 pb et 1322 pb chacune. De plus, les fréquences de recombinaison du plasmide pST85 sont de beaucoup supérieures à celles pouvant être attendues avec des fragments d'homologie de séquence aussi courts. Ces résultats surprenants peuvent s'expliquer de deux façons. D'abord, il est possible que la valeur MEPS ait été surestimée par

l'utilisation d'essais sélectifs qui ne détectent que les recombinants précis contrairement à notre essai qui détecte en plus les événements de recombinaison imprécise. Il se peut aussi que la valeur MEPS soit simplement inférieure dans les cas où les événements de recombinaison sont initiés par une cassure bicaténaire d'ADN.

4.7 EFFET DE LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE SUR LA STRUCTURE DES ÉVÉNEMENTS DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE INDUITS PAR CASSURES BICATÉNAIRES D'ADN.

L'analyse de la structure des recombinants par PCR (Figure 28, section 3.2.4, page 122) a montré que la recombinaison homologue extrachromosomique génère des événements de réparation de types précis et imprécis de la cassure bicaténaire d'ADN. Lorsque les deux séquences LINE portées par les vecteurs pST100 ou pST85 sont alignées, la cassure bicaténaire d'ADN générée dans une des séquences LINE par la digestion enzymatique I-SceI représente en fait une délétion correspondante à la séquence de l'exon néo5' présente dans l'autre séquence LINE qui est non-coupée. Les recombinants qui ont effectué la réparation de cette délétion de façon précise ont acquis les séquences nécessaires pour combler la délétion, c'est-à-dire les séquences de l'exon néo5'. Les recombinants dont la réparation de la délétion est imprécise ont pour leur part acquis l'exon néo5' qui permet l'expression du gène néomycine en plus d'acquérir des séquences supplémentaires et/ou de subir de la dégradation au niveau d'une des séquences LINE situées de chaque côté de la délétion.

Dans les cellules SW480 où le système de MMR est fonctionnel, les proportions d'événements de recombinaison par réparation précise et imprécise de la délétion ne sont pas les mêmes entre les substrats de recombinaison identiques qu'entre les séquences divergentes. Avec les substrats identiques du plasmide pST100, un peu plus de la moitié des événements de recombinaison correspondent à des réparations précises de la délétion (56%) alors qu'avec pST85, donc en présence de 15% de divergence de séquence, on observe presque exclusivement des recombinants par réparation imprécise de la délétion (96%; Tableau V, section 3.2.6, page 140). Ces résultats sont comparables à ceux que nous avons obtenus lors de nos études précédentes (Belmaaza et al., 1994; Villemure et al., 1997). L'étape de formation de l'intermédiaire de recombinaison pourrait être affectée par la divergence de séquence qui interférerait avec l'appariement entre l'extrémité de la cassure bicaténaire d'ADN qui ne participe pas à l'invasion et la boucle d'ADN monocaténaire (Fig. 4e modèle de Szostak, section 1.1.2.1.3, page 16 et fig. 5e modèle de « *one-sided invasion* », section 1.1.2.1.4, page 20) ou le brin d'ADN nouvellement synthétisé (Fig 5d modèle de « *one-sided invasion* ») selon les modèles de recombinaison impliquant une cassure bicaténaire d'ADN. Cette interférence avec l'appariement aurait pour conséquence d'empêcher l'amorce de la synthèse d'ADN à l'extrémité de la cassure qui ne participe pas à l'invasion et de favoriser la dégradation, par des exonucléases, des extrémités libres non-appariées. L'union de l'extrémité qui ne participe pas à l'invasion et qui a subi de la dégradation avec l'extrémité qui a envahi et synthétisé la séquence de l'exon 5', formerait une jonction non-homologue caractéristique des recombinants par

réparation imprécise des cassures bicaténares d'ADN. Il est aussi possible que l'absence d'événement de recombinaison de type précis en présence de divergence de séquence résulte de l'action du système de MMR qui reconnaîtrait les appariements erronés de bases au niveau de l'intermédiaire d'ADN bicaténaire entre l'extrémité qui ne participe pas à l'invasion et la boucle d'ADN monocaténaire ou le brin d'ADN nouvellement synthétisé. En présence de niveaux élevés de divergence de séquences, appariements erronés de bases à corriger sont physiquement rapprochées sur l'intermédiaire d'ADN bicaténaire et les événements de réparation pourraient se chevaucher et causer des coupures bicaténares d'ADN dont la dégradation et l'union subséquente des extrémités entraîneraient aussi la formation de jonctions non-homologues caractéristiques des recombinants par réparation imprécise des cassures bicaténares d'ADN.

Pour vérifier si le système de MMR est impliqué dans la formation des recombinants imprécis entre les séquences divergentes, les recombinants provenant des cellules SKUT-1 dont le système de MMR est non-fonctionnel, ont été analysés de la même façon que les recombinants provenant des cellules SW480. De façon surprenante, nos résultats démontrent que l'absence de système de MMR fonctionnel empêche la formation des recombinants précis qui ne sont plus observés entre les substrats identiques de pST100 tout comme entre les séquences divergentes de pST85 (Tableau V; section 3.2.6, page 140). Ceci suggère que le système de MMR serait nécessaire à la formation de recombinants de type précis ou que la protéine Msh2 qui n'est pas exprimée dans les cellules SKUT-1, serait

impliquée, indépendamment de son rôle dans le système de MMR, dans la formation des recombinants précis. La protéine Msh2 qui peut fixer les jonctions de Holliday (Alani et al., 1997), pourrait interagir avec les intermédiaires de recombinaison pour assurer leur stabilisation afin de permettre leur résolution en recombinants précis. D'ailleurs, le dimère Msh2-Msh3 possède un rôle dans la stabilisation des extrémités d'ADN non-homologues monocaténares générées suite à l'appariement homologue de séquences adjacentes, pour permettre l'élimination de ces séquences non-homologues par l'activité endonucléase du complexe Rad1-Rad10 (Sugawara et al., 1997). Ainsi l'absence de protéine Msh2 dans les cellules SKUT-1 pourrait résulter en une instabilité des intermédiaires de recombinaison qui se traduirait par leur résolution en recombinants imprécis, tant avec pST100 qu'avec pST85. Si la protéine Msh2 possède effectivement un rôle dans la formation des recombinants de type précis qui est indépendant de son implication dans le système de MMR, l'utilisation des cellules SKUT-1 qui ne l'expriment pas, ne permettrait pas de vérifier l'hypothèse que le système de MMR est impliqué dans la formation des recombinants imprécis entre des séquences divergentes. L'utilisation de la lignée cellulaire SKUT-1 ne permet pas de tester l'hypothèse alors que les résultats ne permettent pas non plus son élimination. Il serait toutefois possible de tester l'hypothèse en utilisant une autre lignée cellulaire qui exprime la protéines Msh2 mais dont le système de MMR est non-fonctionnel comme les cellules HCT116.

4.8 LES ÉTAPES DE RECOMBINAISON HOMOLOGUES AFFECTÉES PAR LA DIVERGENCE DE SÉQUENCE ET LE SYSTÈME DE MMR.

Il a été suggéré que les protéines du système de MMR pouvaient exercer un effet anti-recombinogène entre des séquences divergentes, en reconnaissant un intermédiaire d'ADN bicaténaire formé lors de l'étape d'initiation ou encore à une étape subséquente du processus de recombinaison (voir les modèles de recombinaison, section 1.1.2 et 1.1.3). Le déroulement de l'intermédiaire d'ADN bicaténaire ou l'introduction de coupures sur celui-ci provoqueront soit l'interruption de l'événement de recombinaison ou la production d'un intermédiaire de recombinaison réarrangé (Radman, 1988). La divergence de séquence et le système de MMR pourraient exercer leur effet inhibiteur sur la recombinaison spontanée en interférant avec ces étapes du processus de recombinaison.

Selon nos résultats, l'effet inhibiteur de la divergence de séquence et du système de MMR sur la recombinaison homologue spontanée serait dû à une interférence avec l'étape d'initiation plutôt qu'avec une étape plus tardive qui mènerait à la formation d'intermédiaires de recombinaison réarrangés puisque de tels intermédiaires peuvent être détectés avec notre essai.

Il semble aussi que le mécanisme d'initiation de la recombinaison homologue spontanée diffère de celui de la recombinaison induite par une cassure bicaténaire d'ADN puisque la comparaison des deux types de recombinaison avec notre essai, révèle que seule la recombinaison spontanée est affectée par la divergence de

séquence. La recombinaison spontanée ne semble donc pas être initiée par une cassure bicaténaire d'ADN mais plutôt par une cassure monocaténaire d'ADN (Holliday, 1964; Meselson et Radding, 1975) ou par une jonction de type paranémique qui ne nécessite pas de cassure d'ADN (Wilson, 1979; Moore et al., 1988).

Lorsque la recombinaison homologue est induite par une cassure bicaténaire d'ADN, la divergence de séquence et le système de MMR n'interfèrent pas avec l'étape d'initiation mais ils ont un effet sur la nature des événements de recombinaison qui sont générés. Ainsi l'absence de recombinant de type précis en présence de divergence de séquence ou en absence d'un système de MMR fonctionnel indique que ces derniers sont impliqués dans la formation de ces événements.

Nos résultats ont permis de déterminer les effets de la divergence de séquence et du système de MMR sur les intermédiaires d'ADN bicaténaire formés lors de l'initiation de la recombinaison et sur les intermédiaires de recombinaison lors de la recombinaison spontanée et induite par cassures bicairenaires d'ADN, respectivement.

CHAPITRE V

CONCLUSION

L'essai de recombinaison homologue non-sélectif que nous avons mis au point et utilisé dans des cellules de mammifères nous a permis de déceler une différence entre les mécanismes de recombinaison spontanée et de recombinaison induite par une cassure bicaténaire d'ADN.

La recombinaison spontanée semble être affectée au niveau de l'étape d'initiation par la divergence de séquence et le système de MMR. Cette inhibition serait très importante pour maintenir la stabilité du génome en empêchant les séquences non-alléliques de se recombiner entre elles et de former des réarrangements chromosomiques.

Cependant, ces deux facteurs n'affectent pas l'initiation de la recombinaison induite par des cassures bicaténaires d'ADN. Ceci pourrait contribuer à assurer la stabilité du génome en permettant à la cellule de réparer les cassures bicaténaires d'ADN qui peuvent être très mutagènes ou létales si elles ne sont pas correctement réparées. Et puisque la recombinaison homologue semble être l'un des deux principaux mécanismes de réparation de ces lésions chez les mammifères (Liang et al., 1998), il est sûrement plus avantageux pour la cellule de permettre leur réparation par recombinaison homologue avec des séquences non-alléliques que de laisser les lésions non-réparées ou incorrectement réparées par d'autres mécanismes, ce qui engendrerait de l'instabilité génomique. De plus, il est possible que le

système de MMR et probablement d'autres mécanismes (e.g. la méthylation; Maloisel et Rossignol, 1998) assistent la réparation des cassures bicaténares d'ADN par recombinaison homologue de façon à ce que la résolution des intermédiaires de recombinaison en conversion génique soit favorisée au détriment des enjambements qui sont impliqués dans l'instabilité génomique. D'ailleurs, nous avons observé que la divergence entre les séquences et le système de MMR peuvent affecter une étape subséquente de la recombinaison homologue induite par cassures bicaténares d'ADN telle que la maturation et/ou la résolution des intermédiaires de recombinaison. Ceci est supporté par la grande proportion des recombinants imprécis obtenus dans les cellules dont le système de MMR est non-fonctionnel.

Pour vérifier si le système de MMR favorise la résolution des intermédiaires de recombinaison induits par cassures bicaténares d'ADN en conversion génique, il faudrait utiliser notre essai de recombinaison homologue au niveau chromosomique où, contrairement aux essais extrachromosomiques, il serait possible de déterminer si les événements de recombinaison ont été produits par conversion génique ou par enjambement.

Nos résultats montrent aussi que dans les cellules SKUT-1, dont le système de MMR n'est pas fonctionnel (cellules déficientes pour Msh2), la réparation des cassures bicaténares d'ADN se fait exclusivement par des événements de recombinaison de type imprécis, que les substrats de recombinaison soient identiques ou divergents. Afin de vérifier si c'est l'absence d'expression de la

protéine Msh2 ou bien l'absence d'un système de MMR fonctionnel qui empêche la formation de recombinants de type précis, des études sont présentement en cours pour analyser la structure des recombinants provenant de la lignée cellulaire HCT116 (déficiente pour Mlh1) qui exprime la protéine Msh2 mais dont le système de MMR est non-fonctionnel. Il sera aussi intéressant de refaire les expériences dans les cellules SKUT-1/Msh2 lorsque celles-ci auront été complémentées avec la protéine Msh2.

RÉFÉRENCES

- Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M.F., Guerrette, S., Marsischky, G.T., Kolodner, R., Fishel, R. 1996. hMsh2 forms specific mispair-binding complexes with hMsh3 and hMsh6. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93:13629-13634
- Adair, G.M., Scheerer, J.B., Brotheman, A., McConville, S., Wilson, J.H., Rodney, S., Nairn. 1998. Targeted recombination at the Chinese hamster APRT locus using insertion versus replacement vectors. **Somat. Cell Mol. Genet.** 24:91-105
- Alani, E., Lee, S., Kane, M.F., Griffith, J., Kolodner, R.D. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* MSH2, a mispaired base recognition protein, also recognizes Holliday junctions in DNA. **J. Mol. Biol.** 265:289-301
- Alani, E., Reenan, R.A.G., Kolodner, R.D. 1994. Interaction between mismatch repair and genetic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 137:19-39
- Albrechtsen, N., Dornreiter I., Gorsse, F., Kim, E., Wiesmüller, L., Deppert, W. 1999. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. **Oncogene** 18:7706-7717
- Allen, D.J., Makhov, A., Grilley, M., Taylor, J., Thresher, R., Modrich, P., Griffith, J.D. 1997. MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. **EMBO J.** 16:4467-4476
- Au, K.G., Welsh, K, Modrich, P. 1992. Initiation of methyl-directed mismatch repair. **J. Biol. Chem.** 267:12142-12148
- Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L., Wiman, K.G. 1994. p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91:413-417
- Baker, S.M. Bronner, C.E., Zhang, L., Plug, A.W., Robatzek, M., Warren, G., Elliott, E.A., Yu, J., Ashley, T., Arnheim, N., et al. 1995. Male mice defective

in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. **Cell** 82:309-319

- Baker, S.M., Plug, A.W., Prolla, T.A., Bronner, C.E., Harris, A.C., Yao, X., Christie, D.M., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., Ashley, T., Liskay, R.M. 1996. Involvement of mouse MLH1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. **Nature Genet.** 13:336-342
- Ban, C., Yang, W. 1998a. Crystal structure and ATPase activity of MutL: implication for DNA repair and mutagenesis. **Cell** 95:541-552
- Ban, C., Yang, W. 1998b. Structural basis for MutH activation in *E. coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. **EMBO J.** 17:1526-1534
- Barnes, D.E., Stamp, G., Rosewell, I., Denzel, A., Lindahl, T. 1998. Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. **Curr. Biol.** 8:1395-1398
- Bellacosa, A., Cicchillitti, L., Schepis, F., Riccio, A., Yeung, A.T., Matsumoto, Y., Golemis, E.A., Genuardi, M., Neri, G. 1999. MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96:3969-3974
- Belmaaza, A., Chartrand, P. 1994. One sided-invasion events in homologous recombination at double-strand-breaks. **Mut. Res.** 314:199-208
- Belmaaza, A., Milot, E., Villemure, J.-F., Chartrand, P. 1994. Interference of DNA sequence divergence with precise recombinational DNA repair in mammalian cells. **EMBO J.** 13:5355-5360
- Belmaaza, A., Wallenburg, J.C., Brouillette, S., Gusew, N., Chartrand, P. 1990. Genetic exchange between endogenous and exogenous LINE-1 repetitive elements in mouse cells. **Nucleic Acids Res.** 18:6358-6391
- Bennett, C.B., Lewis, A.L., Baldwin, K.K., Resnick., M. 1993. Lethality induced by a single-strand break in a dispensable yeast plasmid, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90:5613-5617

- Benson, F.E., Baumann, P., West, S.C. 1998. Synergetic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. **Nature** 391:401-404
- Bernstein, C., Bernstein, H. 1991. Aging, sex, and DNA repair. Academic Press, San Diego, CA
- Bertrand, P., Rouillard, D., Boulet, A., Levalois, C., Soussi, T., Lopez, B.S. 1997. Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. **Oncogene** 14:1117-1122
- Bhattacharya, N.P., Skandalis, A., Ganesh, A., Groden, J., Meuth, M. 1994. Mutator phenotype in human colorectal carcinoma cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91:6319-6323
- Birnboim, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. **Meth. Enzymol.** 100:243-255
- Birnboim, H.C., Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.** 7:1513-1523
- Bollag, R.J., Waldman, A.S., Liskay, M. 1989. Homologous recombination in mammalian cells, **Annu. Rev. Genet.** 23:199-225
- Borman, A.M., Le Mercier, P., Girard, M., Kean, K.M. 1997. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. **Nucleic Acids Res.** 25:925-932
- Borts, R.H., Leung, W-Y., Kramer, B., Williamson, M., Fogel, S., Haber, J.E. 1990. Mismatch repair-induced meiotic recombination requires the pms1 gene product. **Genetics** 124:573-584
- Brain, R., Jenkins, J.R. 1994. Human p53 directs DNA strand reassociation and is photolabeled by 8-azido ATP. **Oncogene** 9: 1775-1780
- Branch, P., Aquilina, G., Bignami, M., Karran, P. 1993. Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. **Nature** 362:652-654
- Brisebois, J.J., Dubow, M.S. 1993. Selection for spontaneous null mutations in a chromosomally-integrated HSV-1 thymidine kinase gene yields deletions and

- a mutation caused by intragenic illegitimate recombination. **Mutat. Res.** 287:191-205
- Bryant, P.E., Riches, A.C. 1989. Oncogenic transformation of murine C3H 10T1/cells resulting from DNA double-strand breaks induced by a restriction endonuclease. **Br. J. Cancer** 60:852-854
- Buchman, A.R., Berg, P. 1988. Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. **Mol. Cell. Biol.** 8:4395-4405
- Capizzi, R.L., Jameson, J.W. 1973. A table for the estimation of the spontaneous mutation rate of cells in culture. **Mutat. Res.** 17:147-148
- Carney, J.P., Masser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., LeBeau, M., Yates, J.R. 3rd, Hays, L., Morgan, W.F., Petrini, J.H. 1998. The hMre11/Rad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. **Cell** 93:477-486
- Carpenter, A.T.C. 1994. Chiasma function. **Cell** 77:959-962
- Cervantes, M.D., Farah, J.A., Smith, G.R. 2000. Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*. **Mol. Cell.** 5: 883-888
- Chambers, S.R., Hunter, N., Louis, E.J., Borts, R.H. 1996. The mismatch repair system reduces meiotic homeologous recombination and stimulates recombination-dependent chromosome loss. **Mol. Cell. Biol.** 16:6110-6120
- Chen, J., Silver, D.P., Walpita, D., Cantor, S.B., Gazdar, A.F., Tmlinson, G., Couch, F.J., Weber, B.L., Ashley, T., Libingston, D.M., Scully, R. 1998. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumour supressor genes in mitotic and meiotic cells. **Mol. Cell** 2:317-328
- Colbere-Garapin, F., Chousterman, S., Horodniceanu, F., Kourilsky, P., Garapin, A.C. 1979. Cloning of the active thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1 in *Escherichi coli* K-12. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76:3755-3759
- Columna, A.E., Giaccia, A.J., Evans, J.W., Yates, B.L., Morgan, W.F. 1993. Analysis of restriction enzyme-induced chromosomal aberrations by fluorescence *in situ* hybridization. **Environ. Mol. Mutagen.** 22:26-33

- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., Elledge, S.J. 1999. Requirement of ATM dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. **Science** 286:1162-1166
- Cottu, P.H., Muzeau, F., Estreicher, A., Fléjou, J.F., Iggo, R., Thomas, G., Hamelin, R. 1996. Inverse correlation between RER+ status and p53 mutation in colorectal cancer cell lines. **Oncogene** 13:2727-2730
- Critchlow, S.E., Bowater, R.P., Jackson, S.P. 1997. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. **Curr. Biol.** 7:588-598
- Cullen, B.R., Lomedico, P.T., Ju, G. 1984. Transcriptional interference in avian retroviruses: implications for promoter insertion model of leukaemogenesis. **Nature** 307:241-245
- Dao, V., Modrich, P. 1998. Mismatch-, MutS-, MutL-, and helicaseII-dependent unwinding from the single-strand break of an incised heteroduplex. **J. Biol. Chem.** 273:9202-9207
- DasGupta, C., Radding, C.M. 1982. Polar branch migration promoted by RecA protein: effect of mismatched base pairs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79:762-766
- Datta, A., Adjiri, A., New, L., Crouse, G.F., Jinks-Robertson, S. 1996. Mitotic crossovers between diverged sequences are regulated by mismatch repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** 16:1085-1093
- Datta, A., Hendrix, M., Lipsitch, M., Jinks-Robertson, S. 1997. Dual roles for DNA sequence identity and the mismatch repair system in the regulation of mitotic crossing-over in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:9757-9762
- de Vries, S.S., Baart, E.B., Dekker, M., Siezen, A., de Rooij, D.G., de Boer, P., te Riel, H. 1999. Mouse MutS-like protein MSH5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. **Genes Dev.** 13:523-531
- de Wind, N., Deller, M., Berns, A., Radman, M., te Riel, H. 1995. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation

- tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. **Cell** 82:321-330
- Deng, W.P., Nicholoff, J.A. 1994. Mismatch repair of heteroduplex DNA intermediates of extrachromosomal recombination in mammalian cell. **Mol. Cell. Biol.** 14:400-406
- Derbyshire, M.K., Epstein, L.H., Young, C.S.H., Munz, P.L., Fishel, R. 1994. Non homologous recombination in human cells. **Mol. Cell. Biol.** 14:156-169
- Dernburg, A.F., McDonnald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M., Villeneuve, A.M. 1998. Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. **Cell** 94:387-398
- Desautels, L., Brouillette, S., Wallenburg, J.C., Belmaaza, A., Gusew, N., Trudel, P., Chartrand, P. 1990. Characterization of nonconservative homologous junctions in mammalian cells. **Mol. Cell. Biol.** 10:6613-6618
- Digweed, M., Reis, A., Sperling, K. 1999. Nijmegen Breakage Syndrome: consequences of devector DNA double strand break repair. **BioEssays** 21:649-656
- Dong, Z., Zhong, Q., Chen, P.-L. 1999. The Nijmegen Breakage Syndrome protein is essential for the Mre11 phosphorylation upon DNA damage. **J. Biol. Chem.** 274:19513-19516
- Doutriaux, M.P. Wagner, R., Radman, M. 1986. Mismatch-stimulated killing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83:2576-2578
- Drummond, J.T., Li, G.-M., Longley, M.J., Modrich, P. 1995. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. **Science** 268:1909-1912
- Dudenhöffer, C., Rohaly, G., Will, K., Deppert, W., Wiesmüller, L. 1998. Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. **Mol. Cell. Biol.** 18:5332-5342
- Dunaway, M., Olander, E.A. 1993. Local domains of supercoiling activate a eukaryotic promoter *in vivo*. **Nature** 361:746-748

- Durant, S.T., Morris, M.M., Illand, M., McKay, H.J., McCormick, C., Hirst, G.L., Borts, R.H., Brown, R. 1999. Dependence on RAD52 and RAD1 for anticancer drug resistance mediated by inactivation of mismatch repair genes. **Curr. Biol.** 9:51-54
- Edelman, W., Cohen, P., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., et al. 1996. Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. **Cell** 85:1125-1134
- Edelman, W., Cohen, P.E., Kneitz, B., Winand, N., Lia, M., Heyer, J., Kolodner, R., Pollard, J.W., Kucherlapati, R. 1999. Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. **Nature Genet.** 21:123-127
- Ellis, J., Bernstein, A. 1989. Gene targeting with retroviral vectors: recombination by gene conversion into regions of homology. **Mol. Cell. Biol.** 9:1621-1627
- Emerman, M., Temin, H.M. 1984. Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. **Cell** 39:459-467
- Emerman, M., Temin, H.M. 1986. Quantitative analysis of gene suppression in integrated retrovirus vectors. **Mol. Cell. Biol.** 6:792-800
- Emerman, M., Temin, H.M. 1986a. Comparison of promoter suppression in avian and murine retrovirus vectors. **Nucleic Acids Res.** 14:9381-9396
- Essers, J., Hendricks, R.W., Swagemakers, S.M., Troelstra, C., de Wit, J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H., Kanaar, R. 1997. Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. **Cell** 89:194-204
- Evans, E., Sugawara, N., Haber, J., Alani, E. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 mismatch repair protein localizes to recombination intermediates *in vivo*. **Mol. Cell** 5:798-799
- Feinstein, S.I., Low, K.B. 1986. Hyper-recombining recipient strains in bacterial conjugation. **Genetics** 113:13-33
- Feldman, H., Winnacker, E.L. 1993. A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Cell.** 268:12895-12900

- Fishel, R.A., Kolodner, R.D. 1995. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 5:382-395
- Fishman-Lobell, J.N., Rudin, N., Haber, J.E. 1992. Two alternative pathways of double-strand break recombination, the role of the yeast ultraviolet repair gene RAD1. **Science** 258:480-484
- Flores-Rozas, H., Kolodner, R.D. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* MLH3 gene functions in MSH3-dependent suppression of frameshift mutations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95:12404-12409
- Frank, K.M., Sekiguchi, J.M., Seidl, K.J., Swat, W., Rathburn, G.A., Cheng, H.L., Davidson, L., Kangaloo, L., Alt, F.W. 1998. Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. **Nature** 396:173-177
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. 1995. DNA repair and mutagenesis. ASM Press. Washington, DC.
- Galio, L., Bouquet, C., Brooks, P. 1999. ATP hydrolysis-dependent formation of a dynamic ternary nucleoprotein complex with MutS and MutL. **Nucleic Acids Res.** 27: 2325-2361
- Gao, Y., Sun, Y., Frank, K.M., Dikkes, P., Fujiwara, Y., Seidl, K.J., Sekiguchi, J.M., Rathburn, G.A., Swat, W., Wang, J., Bronson, R.T., Malynn, B.A., Bryans, M., Zhu, C., Chaudhuri, J., Davidson, L., Ferrini, R., Stamato, T., Orkin, S.H., Greenberg, M.E., Alt, F.W. 1998. A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphomagenesis and neurogenesis. **Cell** 95:891-902
- Ghattas, I.R., Sanes, J.R., Major, J. 1991. The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos. **Mol. Cell. Biol.** 11:5848-5859
- Glickman, B.W., Radman, M. 1980. *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77:1063-1067

- Gonzalez, R., Silva, J.M., Dominguez, G., Garcia, J.M., Martinez, G., Vargas, J., Provencio, M., Espana, P., Bonilla, F. 1999. Detection of loss of heterozygosity at RAD51, RAD52, RAD54 and BRCA1 and BRCA2 loci in breast cancer: pathological correlation. **Br. J. Cancer** 81:503-509
- Gowen, L.C., Avrutskaya, A.A., Latour, A.M., Koller, B.H., Leadon, S.A. 1998. BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. **Science** 281:1009-1012
- Gradia, S., Acharya, S., Fishel, R. 1997. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. **Cell** 91:995-1005
- Grawunder, U., Wilm, M., Xu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., Lieber, M.R. 1997. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. **Nature** 388:492-495
- Grilley, M., Welsh, K.M., Su, S.-S., Modrich, P. 1989. Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutL gene product. **J. Biol. Chem.** 264:1000-1004
- Gu, L., Hong, Y., McCulloch, S., Watanabe, H., Li, G.M. 1997. ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. **Nucleic Acids Res.** 26:1173-1178
- Gu, L., Hong, Y., McCulloch, S., Watanabe, H., Li, G.M. 1998. ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. **Nucleic Acids Res.** 26:1173-1178
- Guerrette, S., Acharya, S., Fishel, R. 1999. The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **J. Biol. Chem.** 274:6336-6341
- Gupta, M., Fan, S., Zhan, Q., Kohn, K.W., O'Connor, P.M., Pommier, Y. 1997. Inactivation of p53 increases the cytotoxicity of camptothecin in human colon HCT116 and breast MCF-7 cancer cells. **Clin. Cancer Res.** 3:1653-1660
- Haber, J.E. 1992. Mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. **Trends in Genet.** 8:446-452

- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L., Prakash, S. 1996. Binding of insertion /deletion DNA mismatches by the heterodimer of yeast mismatch repair proteins MSH2 and MSH3. **Curr. Biol.** 6:1185-1187
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L., Prakash, S. 1997. Enhancement of MSH2-MSH3-mediated mismatch recognition by the yeast MLH1-PMS1 complex. **Curr. Biol.** 7: 790-793
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L., Prakash, S. 1998. ATP-dependent assembly of a ternary complex consisting of a DNA mismatch and the yeast MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 protein complexes. **J. Biol. Chem.** 273:9837-9841
- Hall, M.C., Matson, S.W. 1999. The *Escherichia coli* MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity. **J. Biol. Chem.** 274:1306-1312
- Hall, M.C., Ozsoy, A.Z., Matson, S.W. 1998. Site-directed mutations in motif VI of *Escherichia coli* DNA helicase II result in multiple biochemical defects: evidence for the involvement of motif VI in the coupling of ATPase and DNA binding activities via conformational changes. **J. Mol. Biol.** 277:257-271
- Harris, S., Rudnicki, K.S., Haber, J.E. 1993. Gene conversion and crossing over during homologous and homeologous ectopic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 135:5-16
- Hawley, R.S. 1988. Exchange and chromosomal segregation in eucaryotes, In Kucherlapati R. and G.R. Smith, eds, Genetic Recombination. American Society for Microbiology. Washington, DC, pp. 497-527
- Hiramoto, T., Nakanishi, T., Sumiyoshi, T., Fukuda, T., Matsuura, S., Tanchi, H., Komatsu, K., Shibasaki, Y., Inui, H., Watatani, M., Miyagawa, K., Kamiya, K. 1999. Mutations of a novel human RAD54 homologue, RAD54B, in primary cancer. **Oncogene** 18:3422-3426
- Hirschman, J.E., Durbin, K.J., Winston, F. 1988. Genetic evidence for promoter competition in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** 8:4608-4615
- Holliday, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. **Genet. Res.** 5:232-304

- Holmes, J.J., Clark, S., Modrich, P. 1990. Strand-specific mismatch correction in nuclear extracts of human and *Drosophila melanogaster* cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87:5837-5841
- Honma, M., Zhang, L.S., Hayashi, M., Takeshita, K., Nakagawa, Y., Tanaka, N., Sofuni, T. 1997. Illegitimate recombination leading to allelic loss and unbalanced translocation in p53-mutated human lymphoblastoid cells. **Mol. Cell. Biol.** 17:4774-4781
- Horii, A., Han, H.-J., Sasaki, S., Shimada, M., Nakamura, Y. 1994. Cloning, characterization and chromosomal assignments of the human genes homologous to yeast PMS1, a member of mismatch repair genes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 204:1257-1264
- Hughes, M.J., Jiricny, J. 1992. The purification of a human mismatch-binding protein and identification of its associated ATPase and helicase activities. **J. Biol. Chem.** 267:23876-23882
- Hunter, N., Borts, R.H. 1997. MLH1 is unique among mismatch repair proteins in its ability to promote crossing-over during meiosis. **Genes Dev.** 11:1573-1582
- Hutchison, C.A.III, Hardies, S.C., Loeb, D.D., Shehee, W.D., Edgell, M.H. 1989. LINEs and related retroposons: long interspersed repeated sequences in the eukaryotic genome. In Berg, D.E. et Howe, M.M. eds Mobile DNA. American Society for Microbiology. Washington, DC, pp.593-617
- Jackson, J.A., Jeggo, P.A. 1995. DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. **Trends Biochem. Sci.** 20:412-415
- Janus, F., Albrechtsen, N., Knippschild, U., Wiesmüller, L., Grosse, F., Deppert, W. 1999. Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. **Mol. Cell. Biol.** 19:2155-2168
- Jeffs, A.R., Benjes, S.M., Smith, T.L., Sowerby, S.J., Morris, C. 1998. The BCR gene recombines preferentially with Alu elements in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukemia. **Hum. Mol. Gen.** 7:767-776
- Jeggo, P.A. 1997. DNA breakage and repair. **Adv. Genet.** 38:185-218

- Jinks-Robertson, S., Michelitch, M., Ramcharan, S. 1993. Substrate length requirement for efficient mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** 13:3937-3950
- Johnson, R.D., Liu, N., Jasin, M. 1999. Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. **Nature** 401: 397-399
- Johnson, R.E., Kovvali, G.K., Guzder, S.N., Amin, N.S., Holm, C., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L., Prakash, S. 1996. Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair. **J. Biol. Chem.** 271: 27987-27990
- Karran, P. 2000. DNA double strand break repair in mammalian cells. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 10:144-150
- Karran, P., Marinus, M.G. 1982. Mismatch correction of O⁶-methylguanine residues in *E. coli* DNA. **Nature** 296:868-869
- Kat, A., Thilly, W.G., Fang, W.-H., Longley, M.J., Li, G.-M., Modrich, P. 1993. An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90:6424-6428
- Kenneth, J.M. 2000. Replication and recombination intersect. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 10:151-1567
- Kim, E., Albrechtsen, N., Deppert, W. 1997. DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. **Oncogene** 15:857-869
- Klar, A.J.S. 1992. In "The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Gene expression" (E.W. Jones, J.R. Pringle, and J.R. Broach, eds), p. 745. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Kleckner, N. 1996. Meiosis: how could it work? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93:8167-8174
- Koi, M., Umar, A., Boyer, J.C., Evans, A.C., Berchuck, A., Kunkel, T.A., Barrett, J.C. 1994. Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

- tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. **Cancer Res.** 54:4308-4312
- Kokoska, R.J., Stefanovic, L., Buermeier, A.B., Liskay, R.M., Petes, T.D. 1999. A mutation of the yeast gene encoding PCNA destabilizes both microsatellite and minisatellite DNA sequences. **Genetics** 151:511-519
- Kolodner, R. 1996. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. **Genes Dev.** 10:1433-1442
- Kondo, E., Horii, A., Fukushige, S. 1999. The human PMS2 proteins do not interact with hMLH1, a major DNA mismatch repair protein. **J. Biochem.** 125:818-825
- Kramer, B., Kramer, W., Williamson, M.S., Fogel, S. 1989. Heteroduplex DNA correction in *Saccharomyces cerevisiae* is mismatch specific and requires functional PMS genes. **Mol. Cell. Biol.** 9:4432-4440
- Labuda, D., Zietkiewicz, E., Mitchell, G.A. 1995. Alu elements as a source of genomic variation: deleterious effects and evolutionary novelties, pp. 1-24. Maraia, R.J. (ed), The impact of short interspersed elements (SINEs) on the host genome. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany
- Lane, D.P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature** 358:15-16
- Lankenau, D.H. 1995. Genetics of genetics in *Drosophila*: P elements serving the study of homologous recombination, gene conversion and targeting. **Chromosoma** 103:659-668
- Lasko, D., Cavenee, W., Nordenskjöld, M. 1991. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. **Annu. Rev. Genet.** 25:281-314
- Lawin, R.M., Efstratiadis, A., O'Connell, C., Maniatis, T. 1980. The nucleotide sequence of the human beta-globin gene. **Cell** 21:647-651
- Lee, S., Cavallo, L., Griffith, J. 1997. Human p53 binds holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. **J. Biol. Chem.** 272:7532-7539
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A.J., Griffith, J. 1995. p53 and its 14kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. **Cell** 81:1013-1020

- Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1997. Genetic instability in colorectal cancer. **Nature** 386:623-627
- Lewin, B. In Genes V. Oxford university press, Oxford, Chap. 31
- Lewis, S.M. 1994. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. **Adv. Immunol.** 56:27-150
- Li, B., Comai, L. 2000. Functional interaction between Ku and the werner syndrome protein in DNA end processing. **J. Biol. Chem.** 275 :28349-28352
- Li, G.-M., Modrich, P. 1995. Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:1950-1954
- Liang, F., Han, M., Romanienko, P.J., Jasin, M. 1998. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:5172-5177
- Liang, F., Romanienko, P.J., Weaver, D.T., Jeggo, P.A., Jasin, M. 1996. Chromosomal double-strand break repair in Ku80 deficient cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93:8929-8933
- Liao, D., Pavelitz, T., Kidd, J.R., Kidd, K.K., Weiner, A.M. 1997. Concerted evolution of the tandemly repeated genes encoding human U2snRNA (the RNU2 locus) involves rapid intrachromosomal homogenization and rare interchromosomal gene conversion. **EMBO J.** 3:588-598
- Lim, D.S., Hasty, P. 1996. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethality that is suppressed by a mutation in p53. **Mol. Cell. Biol.** 16:7133-7143.
- Lin, F.L., Sperle, K., Sternberg, N. 1984. Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. **Mol. Cell. Biol.** 4: 1020-1034
- Lin, F.L., Sperle, K.M., Sternberg, N.L. 1987. Extrachromosomal recombination in mammalian cells as studied with single- and double-stranded DNA substrates. **Mol. Cell. Biol.** 7:129-140

- Liskay, R.M., Letsou, A., Stachelek, J.L., 1987. Homology requirement for efficient gene conversion between duplicated chromosomal sequences in mammalian cells. **Genetics** 115:161-167
- Liu, N., Lamerdin, J.E., Tebbs, R.S., Schild, D., Tucker, J.D., Shen, M.R., Brookman, K.W., Siciliano, M.J., Walter, C.A., Fan, W., Narayana, L.S., Zhou, Z.Q., Adamson, A.W., Soresen, K.J., Chen, D.J., Jones, N.J., Thompson, L.H. 1998. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. **Mol. Cell** 1:783-793
- Loeb, L.A. 1991. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. **Cancer Res.** 51:3075-3079
- Lukacsovich, T., Waldman, A.S. 1999. Suppression of intrachromosomal gene conversion in mammalian cells by small degrees of sequence divergence. **Genetics** 151:1559-1568
- Luo, G., Yao, M.S., Bender, C.F., Mills, M., Bladl, A.R., Bradley, A., Petrini, J.H.J. 1999. Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionising radiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96:7376-7381
- Luria, S.F., Delbrück, M. 1943. Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. **Genetics** 28:491-511
- Lynch, H.T., de la Chapelle, A. 1999. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. **J. Med. Genet.** 36 :801-818
- Maloisel, L., Rossignol, J.L. 1998. Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascobolus*. **Genes Dev.** 12:1381-1389
- Marsischky, G.T., Filosi, M., Kane, M.F., Kolodner, R. 1996. Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. **Genes Dev.** 10:407-420
- Matic, I. Rayssiguier, C., Radman, M. 1995. Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. **Cell** 80:507-515

- Matsuda, M., Miyagawa, K., Takahashi, M., Fukuda, T., Kataoka, T., Asahara, T., Inui, H., Watatani, M., Yasutomi, M., Kamada, N., Dohi, K., Kamiya, K. 1999. Mutations in the RAD54 recombination gene in primary cancers. **Oncogene** 18:3427-3430
- Mekeel, K.L., Tang, W., Kachnic, L.A., Luo, C.-M., DeFrank, J.S., Powell, S.N. 1997. Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. **Oncogene** 14:1847-1857
- Meselson, M.S., Radding, C.M. 1975. A general model for genetic recombination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 72:358-361
- Milne, G.T., Jin, S., Shannon, K.B., Weaver, D.T. 1996. Mutation in two Ku homologs define a DNA end joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** 16:4189-4198
- Mimori, T., Hardin, J.A. 1986. Mechanism of interaction between Ku proteins and DNA. **J. Biol. Chem.** 261:10375-10379
- Mimori, T., Ohosone, Y., Hama, N., Suwa, A., Akizuki, M., Homma, M., Griffith, A.J., Hardin, J.A. 1990. Isolation and characterization of cDNA encoding the 80-kDa subunit protein of the human autoantigen Ku (p70/p80) recognized by autoantibodies from patients with scleroderma-polymyositis overlap syndrome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87:1777-1781
- Mizuta, R., LaSalle, J.M., Cheng, H.-L., Shinohara, A., Ogawa, H., Copeland, N., Jenkins, N.A., LaLande, M., Alt, F.W. 1997. RAB22 and RAB163/mouse BRCA2: proteins that specifically interact with the RAD51 protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:6927-6932
- Modrich, P. 1991. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. **Annu. Rev. Genet.** 25:229-253
- Modrich, P. 1997. Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. **J. Biol. Chem.** 272:24727-24730
- Modrich, P., Lahue, R. 1996. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. **Annu. Rev. Biochem.** 65:101-133

- Moore, S.P., Rich, A., Fishel, R. 1988. The human recombination strand exchange process. **Genome** 31:45-52
- Morris, C., Jeffs, A., Smith, T., McDonald, M., Bord, P., Kennedy, M., Fitzgerald, P. 1996. BCR gene recombines with genomically distinct sites on band 11q13 in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukemia. **Oncogene** 12: 677-685
- Mudgett, J.S., Taylor W.D. 1990. Recombination between irradiated shuttle vector DNA and chromosomal DNA in African green monkey kidney cells. **Mol. Cell. Biol.** 10:37-46
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Müller, B., Wiesmüller, L., Deppert, W., Große, F. 1996. p53 protein exhibits 3'-5' exonuclease activity. **Cell** 85:1089-1099
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., Kowalczykowski, S.C. 1998. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. **Nature** 391:407-409
- Nicholson, A., Hendrix, M., Jinks-Robertson, Crouse, G.F. 2000. Regulation of mitotic homeologous recombination in yeast. Functions of mismatch repair and nucleotide excision repair genes. **Genetics** 154:133-146
- Nicolas, A. 1998. Relationship between transcription and initiation of meiotic recombination: toward chromatin accessibility. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95:87-89
- Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M.C., Li, G.C. 1996. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. **Nature** 382:551-555
- Obersler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., Stahl, H. 1993. p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. **EMBO J.** 12:2389-2396
- Orr-Weaver, T.L. 1999. Perspectives: cell cycle. The difficulty in separating sisters. **Science** 285:344-345
- Ouyang, H., Nussenzweig, A., Kurimasa, A., Soares, V.C., Li, X., Cordon-Cardo, C., Li, W.H., Cheong, N., Nussenzweig, M., Iliakis, G., Chen, D.J., Li, G.C.

1997. Ku70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination *in vivo*. **J. Exp. Med.** 186:921-929
- Panyutin, I.G., Hsieh, P. 1993. Formation of a single mismatch impedes spontaneous DNA branch migration. **J. Mol. Biol.** 230:413-424
- Pâques, F., Haber, J.E. 1997. Two pathways for removal of non-homologous DNA ends during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** 17:6765-6771
- Parsons, R., Li, G.-M., Longley, M.J., Fang, W., Papadopoulos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Modrich, P. 1993. Hypermutable and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. **Cell** 75:1227-1236
- Patel, K.J., Yu, V.P.C.C., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F.C., Evans, M.J., Colledge, W.H., Friedman, L.S., Ponder, B.A.J., Venkitaraman, A.R. 1998. Involvement of Brca2 in DNA repair. **Mol. Cell** 1:347-357
- Pavelitz, T., Liao, D., Weiner, A.M. 1999. Concerted evolution of the tandem array encoding primate U2 snRNA (the RNU2 locus) is accompanied by dramatic remodeling of the junction with flanking chromosomal sequences. **EMBO J.** 18:3783-3792
- Petit, M.A., Dimpfl, J., Radman, M., Echols, M. 1991. Control of large chromosomal duplication in *Escherichia coli* by the mismatch repair system. **Genetics** 129: 327-332
- Pierce, A.J., Johnson, R.D., Thompson, L.H. Jasin, M. 1999. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. **Genes Dev.** 13:2633-2638
- Porter, G., Westmoreland, J., Priebe, S., Resnick, M.A. 1996. Homologous and homeologous intermolecular gene conversion are not differentially affected by mutations in the DNA damage or the mismatch repair genes RAD1, RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, PMS1 and MSH2. **Genetics** 143:755-767

- Priebe, S.D., Westmoreland, J., Nilsson-Tillgren, T., Resnick, M.A. 1994. Induction of recombination between homologous and diverged DNAs by double-strand gaps and breaks and role of mismatch repair. **Mol. Cell. Biol.** 14:4802-4814
- Prolla, T.A. Christie, D.M., Liskay, R.M. 1994. Dual requirement in yeast DNA mismatch repair for MLH1 and PMS1, two homologs of the bacterial mutL gene. **Mol. Cell. Biol.** 14:407-415
- Prolla, T.A., Baker, S.M., Harris, A.C., Tsao, J.L., Yao, W. Bronner, C.E., Zheng, B., Gordon, M., Reneker, J., Arnheim, N., Shibata, D., Bradley, A., Liskay, R.M. 1998. Tumor susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. **Nature Genet.** 18:276-279
- Prolla, T.A., Pang, Q., Alani, E., Kolodner, R.D., Liskay, R.M. 1994. Interactions between the Msh2, Mlh1 and Pms1 proteins during the initiation of DNA mismatch repair. **Science** 265:1091-1093
- Proudfoot, N.J. 1986. Transcriptional interference and termination between duplicated α -globine gene constructs suggests a novel mechanism for gene regulation. **Nature** 322:562-565
- Puchta, H., Dujon, B, Hohn, B. 1996. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 93:5055-5060
- Qiu, J., Qian, Y., Chen, V., Guan, M.X., Shen, B. 1999. Human exonuclease 1 functionally complements its yeast homologues in DNA recombination, RNA primer removal, and mutation avoidance. **J. Biol. Chem.** 274:17893-17900
- Radding, C.M. 1988. Homologous pairing and strand exchange promoted by Escherichia coli RecA protein. In Kucherlapati R. and G.R. Smith, eds, Genetic Recombination. American Society for Microbiology. Washington, DC, pp. 193-229
- Radman, M. 1988. Mismatch repair and genetic recombination. In Kucherlapati R. and G.R. Smith, eds, Genetic Recombination. American Society for Microbiology. Washington, DC, pp.169-192

- Radman, M. 1989. Mismatch repair and the fidelity of genetic recombination. **Genome** 31:68-73
- Rayssiguier, C., Thaler, D.S., Radman, M. 1989. The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. **Nature** 342:396-400
- Resnick, M.A. 1976. The repair of double-strand breaks in DNA; a model involving recombination. **J. Theor. Biol.** 59:97-106
- Resnick, M.A., Bennett, C., Perkins, E., Porter, G., Priebe, S.D. 1995. Double-strand breaks and recombinational repair: the rôle of processing, signalling, and DNA homology. In (Rose, A.H., Wheals, A.E., and Harrison, J.S., eds, The yeasts, Vol. 6, Academic Press, New York, p. 357
- Richards, B., Zhang, H., Phear, G., Meuth, M. 1997. Conditional mutator phenotypes in hMSH2-deficient tumor cell lines. **Science** 277:1449-1450
- Rijkers, T., van den Ouweland, J., Morolli, B., Rolink, A.G., Baarends, W.M., van Sloun, P.P., Lohman, P.H., Pastink, A. 1998. Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. **Mol. Cell. Biol.** 18:6423-6429
- Risinger, J.I., Umar, A., Boyer, J.C., Evans, A.C., Berchuck, A., Kunkel, T.A., Barrett, J.C. 1995. Microsatellite instability in gynecological sarcomas and in hMSH2 mutant uterine sarcoma cell lines defective in mismatch repair activity. **Cancer Res.** 55:5664-5669
- Roeder, G. 1990. Chromosome synapsis and genetic recombination: their roles in meiotic chromosome segregation. **Trends Genet.** 6:385-389
- Roth, D., Wilson, J. 1988. Illegitimate recombination in mammalian cells. In Kucherlapati R. and G.R. Smith, eds, Genetic Recombination. American Society for Microbiology. Washington, DC, p. 621
- Rouet, P., Smith, F., Jasin, M. 1994. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91:6064-6068

- Rouet, P., Smith, F., Jasin, M. 1994. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. **Mol. Cell. Biol.** 14:8096-8106
- Rubin, E., Levy, A.A. 1997. Abortive gap repair: Underlying mechanism for Ds element formation. **Mol. Cell. Biol.** 17:6294-6302
- Rubnitz, J., Subramani, S. 1984. The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. **Mol. Cell. Biol.** 4:2253-2258
- Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. In *Molecular cloning, A laboratory manual*, 2nd ed. Cold spring harbor laboratory press, Chap.18
- Sancar, A., Hearst, J.E. 1993. Molecular matchmaker. **Science** 259:1415-1420
- Sargent, R.G., Brenneman, M.A, Wilson, J.H. 1997. Repair of site-specific double-strand break in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. **Mol. Cell. Biol.** 17:267-277
- Schmutte, C., Marinescu, R.C., Sadoff, M.M., Guerrette, S., Overhauser, J., Fishel, R. 1998. Human exonuclease 1 interacts with the mismatch repair protein hMSH2. **Cancer Res.** 58:4537-4542
- Schoenmakers, E.F., Huysmans, C., Van de Ven, W.J. 1999. Allelic knockout of novel splice variants of human recombination repair gene RAD51B in t(12:14) uterin leiomyomas. **Cancer Res.** 59:19-23
- Schwab, M. 1998. Amplification of oncogenes in human cancer cells. **BioEssays** 20: 473-479
- Scully R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., Livingston, D.M. 1997. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. **Cell** 88: 265-275
- Sharan, S.K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D.-S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., Bradley, A.. 1997. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. **Nature** 386:804-810
- Shen, P., Huang, H.V. 1986. Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. **Genetics** 112:441-457

- Shen, P., Huang, H.V. 1989. Effects of base pair mismatches on recombination via the RecBCD pathway. **Mol. Gen. Genet.** 218:358-360
- Shinohara, A., Ogawa, T. 1995. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. **Trends Biochem. Sci.** 20:387-391
- Simchen, G., Hugerat, Y. 1993. What determines whether chromosomes segregate reductionally or equationally in meiosis? **BioEssays** 15:1-8
- Smider, V., Rathmell, W.K., Lieber, M.R., Chu, G. 1994. Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA. **Science** 266:288-291
- Smith, A.F. 1996. The origin of interspersed repeats in the human genome. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 6:743-748
- Smith, K., Nicolas, A. 1998. Recombination at work for meiosis. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 8:200-211
- Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R., Bradley, A., 1991. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. **Cell** 64:693-702
- Southern, P.J., Berg, P. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. **J. Mol. App. Genet.** 1:327-341
- Stahl, F. 1996. Meiotic recombination in yeast: coronation of the double-strand break repair model for recombination. **Cell** 87:965-968
- Stewart, G.S., Maser, R.S., Stankovic, T., Bressan, D.A., Kaplan, M.I., Caspers, N.G.J., Raams, A., Byrd, P.J., Petrini, J.H.J., Taylor, A.M.R. 1999. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an Ataxia-Telangiectasia-like disorder. **Cell** 99:577-587
- Stürzbecher, H.-W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., Buchhop, S. 1996. p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. **EMBO J.** 15:1992-2002
- Sugawara, N., Haber, J.E. 1992. Characterisation of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. **Mol. Cell. Biol.** 12:563-575

- Sugawara, N., Pâques, F., Colaiacovo, M., Haber, J.E. 1997. Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:9214-9219
- Sun, H., Treco, D., Szostak, J.W. 1991. Extensive 3'-overhanging, single strand DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. **Cell** 64:1155-1161
- Sung, P. 1997. Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. **Genes Dev.** 11:1111-1121
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., Stahl, F.W. 1983. The double-strand break repair model for recombination. **Cell.** 33:25-35
- Taccioli, G.E., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestley, A., Demegeot, J., Mizuta, R., Lehman, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P., Jeggo, P.A. 1994. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. **Science** 265:1442-1445
- Tan, T.L.R., Essers, J., Citterio, C., Swagemakers, S.M.A., de Wit, J., Benson, F.E., Hoeijmakers, J.H.J., Kanaar, R. 1999. Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. **Curr. Biol.** 9:325-328
- Teo, S.H., Jackson, S.P. 1997. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* DNA ligase IV: involvement of DNA double-strand break repair. **EMBO J.** 16:4788-4795
- Thomas, D.C., Roberts, J.D., Kunkel, T.A. 1991. Heteroduplex repair in extracts of human HeLa cells. **J. Biol. Chem.** 266:3744-3751
- Tishkoff, D.X., Amin, N.S., Viars, C.S., Arden, K.C., Kolodner, R.D. 1998. Identification of a human gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, an exonuclease implicated in mismatch repair and recombination. **Cancer Res.** 58:5027-5031
- Tishkoff, D.X., Boerger, A.L., Bertrand, P., Filosi, N., Gaida, G.M., Kane, M.F., Kolodner, R.D. 1997. Identification and characterization of *Saccharomyces*

- cerevisiae* EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:7487-7492
- Tran, H.T., Gordenin, D.A., Resnick, M.A. 1999. The 3'→5' exonucleases of DNA polymerases delta and epsilon and the 5'→3' exonuclease Exo1 have major roles in postreplication mutation avoidance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** 19:2000-2007
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K, et al. 1996. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93:6236-6240
- Umar, A., Boyer, J.C., Thomas, D.C., Nguyen, D.C., Risinger, J.I., Boyd, J., Ionov, Y., Perucho, M., Kunkel, T.A. 1994. Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability. **J. Biol. Chem.** 269:14367-14370
- Umar, A., Buermeier, A.B., Simon, J.A., Thomas, D.C., Clark, A.B., Liskay, R.M., Kunkel, T.A. 1996. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. **Cell** 87:65-73
- Umar, A., Koi, M., Risinger, J.I., Glaab, W.E., Tindall, K.R. et al. 1997. Correction of hypermutability. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine resistance, and defective DNA mismatch repair by introducing chromosome 2 into human tumor cells with mutations in MSH2 and MSH6. **Cancer Res.** 57:3949-3955
- Vedel, M., Nicolas, A. 1999. CYS3, a hotspot of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Effects of heterozygosity and mismatch repair functions on gene conversion and recombination intermediates. **Genetics** 151:1245-1259
- Villemure, J.-F., Belmaaza, A., Chartrand, P. 1997. The processing of DNA ends at double-strand breaks during homologous recombination: different roles for the two ends. **Mol. Gen. Genet.** 256:533-538
- Viswanathan, M., Lovett, S.T. 1998. Single-strand DNA-specific exonucleases in *Escherichia coli*. Roles in repair and mutation avoidance. **Genetics** 149:7-16

- Vulic, M., Dionision F., Taddei, F., Radman, M. 1997. Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in Enterobacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:9763-9767
- Wake, C.T., Vernalone, F., Wilson, J.H. 1985. Topological requirements for homologous recombination among DNA molecules transfected into mammalian cells. **Mol. Cell. Biol.** 5:2080-2089
- Waldman, A.S., Liskay, R.M. 1987. Differential effects of base-pair mismatch on intrachromosomal versus extrachromosomal recombination in mouse cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84:5340-5344
- Waldman, A.S., Liskay, R.M. 1988. Dependence of intrachromosomal recombination in mammalian cells on uninterrupted homology. **Mol. Cell. Biol.** 8:5350-5357
- Wang, S., Magoulas, C., Hickey, D. 1999. Concerted evolution within a trypsin gene cluster in *Drosophila*. **Mol. Biol. & Evol.** 16:1117-1124
- Ward, J.F. 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and repairability. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.** 35:95-125
- Ward, J.F. 1995. Radiation mutagenesis: the initial lesions responsible. **Radiat. Res.** 142:362-368
- Weiner, B.M., Kleckner, N. 1994. Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast. **Cell** 77:977-991
- Wendel, J.F. 2000. Genome evolution in polyploids. **Plant Mol. Biol.** 42:225-249
- Westmoreland, J., Porter, G., Radman, M., Resnick, M.A. 1997. Highly mismatched molecules resembling recombination intermediates efficiently transform mismatch repair proficient *Escherichia coli*. **Genetics** 145:29-38
- White, C.I., Haber, J.E. 1990. Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.** 9:663-673

- Wierenga, B., Hofer, E., Weissmann, C. 1984. A minimal intron length but no specific internal sequence is required for splicing the large rabbit β -globin intron. **Cell** 37:915-925
- Willers, H., McCarthy, E.E., Wu, B., Wunsch, H., Tang, W., Taghian, D.G., Xia, F., Powell, S.N. 2000. Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control. **Oncogene** 19:632-639
- Wilson, D.M. 3rd, Carney, J.P., Coleman, M.A., Adamson, A.W., Christensen, M., Lamerdin, J.E. 1998. Hex1: a new human Rad2 nuclease family member with homology to yeast exonuclease 1. **Nucleic Acids Res.** 26:3762-3768
- Wilson, J.H. 1979. Nick-free formation of reciprocal heteroduplex: a simple solution to the topological problem. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76:3641-3645
- Wilson, T.E., Grawunder, U., Lieber, M.R. 1997. Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. **Nature** 388:428-429
- Wong, A.K.C., Pero, R., Ormonde, P.A., Tavtigian, S.V., Bartel, P.L. 1997. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility brca2. **J. Biol. Chem.** 272:31941-31944
- Woods, L.M., Hodges, C.A., Baart, E., Baker, S.M., Liskay, M., Hunt, P.A. 1999. Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female mlh1 mutant mice. **J. Cell. Biol.** 145:1395-1406
- Worth, L.Jr., Clark, S., Radman, M., Modrich, P. 1994. Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91:3238-3241
- Wu, T.-H., Marinus, M.G. 1999. Deletion mutation analysis of the *mutS* gene in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 274:5948-5952
- Yamaguchi, M., Dao, V., Modrich, P. 1998. MutS and MutL activate DNA helicaseII in a mismatch-dependent manner. **J. Biol. Chem.** 273: 9197-9201
- Yamaguchi-Iwai, Y., Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Yamashita, Y.M., Yagi, T., Takada, M., Price, C., Kakazu, N.,

- Takeda, S. 1999. Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. **EMBO J.** 18: 6619-6629
- Yaneva, M., Kowalewski, T., Lieber, M.R. 1997. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. **EMBO J.** 16:5098-5112
- Zahrt, T.C., Maloy, S. 1997. Barriers to recombination between closely related bacteria: MutS and RecBCD inhibit recombination between *Salmonella typhimurium* and *Salmonella Typhi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:9786-9791
- Zahrt, T.C., Mora, G.C., Maloy, S. 1994. Inactivation of mismatch repair overcomes the barrier to transduction between *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. **J. Bacteriol.** 176:1527-1529
- Zheng, H. et Wilson, J.H. 1990. Gene targeting in normal and amplified cell lines. **Nature** 344:170-173
- Zhong, Q., Chen, C.-F., Li, S., Chen, Y., Wang, C.-C., Xiao, J., Chen, P.-L., Sharp, Z.D., Lee, W.-H. 1999. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. **Science** 285:747-750
- Zhu, C., Bogue, M., Lim, D.S., Hasty, P., Roth, D. 1996. Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. **Cell** 86:379-389

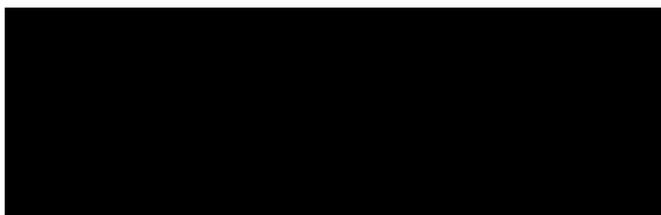
ANNEXE I

**EFFECTS OF SEQUENCE DIVERGENCE ON THE EFFICIENCY OF
EXTRACHROMOSOMAL RECOMBINATION IN MISMATCH REPAIR
PROFICIENT AND DEFICIENT MAMMALIAN CELL LINES**

Recombination in MMR proficient and deficient cells

Josée-France Villemure and Abdellah Belmaaza*

Molecular Biology Program and Department of Microbiology-Immunology,
Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame, CHUM.
Institut du Cancer de Montréal, 1560 Sherbrooke est, J.A. de Sève Y-4612, Montréal,
Québec, Canada, H2L 4M1.



ABSTRACT

We have examined the effect of sequence divergence on the efficiency of recombination in mismatch repair proficient and deficient cell lines by using an exon-switch based assay that involves introns as recombination substrates. Sequence divergence of 15% decreased spontaneous recombination by six-fold in mismatch repair proficient cells but only three- and two- fold in human cells with defects in mismatch repair genes *MLH1* and *MSH2*, respectively. The decrease in recombination efficiency in mismatch repair proficient background does not seem to be due to the production of rearranged recombination intermediates since these were readily detectable in the assay system we used. In contrast, the efficiency of double-strand break-induced recombination was not affected by sequence divergence in mismatch repair proficient or deficient background. These results indicate that sequence divergence and mismatch repair block initiation of spontaneous recombination but not recombinational repair of double-strand breaks. The differential sensitivity of these two processes may be required for genome stability.

Key words : Homologous recombination, Sequence divergence, Mismatch repair, DSB repair, mammalian cells.

INTRODUCTION

Homologous recombination between imperfectly matched (diverged) sequences, referred to as homeologous recombination, involves the formation of heteroduplex DNA in which single strands of DNA derived from different parental duplexes are base paired. Mismatched bases in the heteroduplex DNA are corrected by the postreplicative mismatch repair (MMR) system and such correction can result either in restoration of parental markers or gene conversion; a non-reciprocal exchange of parental markers. Although mismatches are usually used to determine the contribution of each parental duplex in recombination, sequence divergence has been found to decrease the efficiency of recombination in almost all organisms studied (1). Such a roadblock to recombination may help to conserve genomic stability by preventing recombination between diverged repetitive elements (2).

In bacteria and yeast, much of the roadblock imposed by sequence divergence on homologous recombination derives from the action of the MMR systems (1). In *E. coli*, the MMR proteins MutS and MutL are required for recognizing mismatched base pairs and assembling other proteins involved in the removal and correction of the mismatch. In yeast, as well as in mammalian cells, at least three MutS homologues, MSH2, MSH3 and MSH6, and four MutL homologues, MLH1, MLH3, PMS1 and PMS2, appear to be required for mismatch recognition and repair. MSH2 and MLH1 are the key proteins in this process (1, 3, 4). Bacterial strains with mutations in either MutS or MutL exhibit a 1000-fold increase in the rate of homeologous recombination (5). This

effect is less pronounced in yeast, however. The yeast *MutL* homologues play a significantly less important role in suppressing chromosomal homeologous recombination than does *MSH2* (6-8). The recombination rate increases by only up to 10-fold in *mlh1* and *pms1* mutants and this is independent of the degree of sequence divergence (8, 9). In contrast, the recombination rate increases by up to 140-fold in *msh2* mutants but in this case the increase depends on the degree of sequence homology and is much less pronounced for sequence divergence over 10% (10). However, inactivation of the *MSH2* gene or the *PMS1* gene did not alter the efficiency of extrachromosomal homeologous recombination by more than two-fold (11, 12).

Relatively few studies have examined recombination in mammalian MMR mutant cells. One study has indicated that MMR may also play an important role in the control of homeologous recombination in mouse cells: the 50-fold decrease in the efficiency of gene targeting between 0.6% diverged sequences in wild type mouse cells was no more observed in *MSH2* deficient cells (13). Other studies have examined the effect of human *PMS2* and *MLH1* on homologous rather than homeologous recombination (14, 15). The frequency of spontaneous intrachromosomal homologous recombination was increased by 20-fold in human *PMS2* deficient cells (14), but that of extrachromosomal homologous recombination between linear plasmids was not affected in human *MLH1* deficient cells relative to wild type cells (15).

The mechanism(s) by which sequence divergence and MMR decrease the efficiency of homologous recombination are still not clearly

understood. However, it has been suggested that MMR proteins may exert their anti-recombination role by recognizing highly mismatched heteroduplex recombination intermediates, after which the heteroduplex is either unwound or destroyed by the nicking of adjacent mismatches (16). The target heteroduplex intermediate can be formed either during initiation of recombination or at later steps in the recombination process (17-20). Thus, unwinding and/or nicking of a heteroduplex intermediate may either abort a recombination initiation event, produce a rearranged recombination intermediates, or both (16). It is difficult to guess which of these possibilities is more likely when using assay systems in which the end products of recombination are functional selectable marker genes; aborted initiation event or rearranged intermediates would escape detection in this type of assays.

To gain further insight into the effects of sequence divergence and MMR on recombination in mammalian cells, we analysed recombination between plasmid-borne identical and diverged DNA sequences in MMR proficient and deficient cells. The recombination substrates we used do not encode a selection function, but are used solely to rearrange an intronic sequence which, when properly aligned by recombination events, results in a spliceable marker gene. Hence, aborted initiation events or rearranged recombination intermediates that would otherwise escape selectable assays would be expected to be detectable in this assay.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs. The plasmids pST100 and pST85 carrying respectively 100% and 85% homologous LINE-1 sequences as intronic recombination substrates were constructed by using pMC1*neopA* (Stratagene) containing the neomycin-resistance gene (*neo*), and pUC19 (New England BioLabs) as a backbone. A synthetic intron, which is 59 bp long and contains a NotI restriction site was designed and inserted into the unique PvuII restriction site of the *neo* gene coding region of pMC1*neopA* to construct pMC1*neoInt*. The intron contains the basic elements essential for its splicing : a 5' donor site (GT), a branch site (CACTGAC) and a 3' acceptor site (AG). The 5' exon of the *neo* gene (*neo5'*) (AvaI-NotI fragment from pMC1*neoInt*) was inserted into the unique Sall site of L1Md-A2 (a mouse LINE-1 element) in pL1-100 and pL1-85 to generate pL1-100*neo5'* and pL1-85*neo5'* respectively. pL1-100 contains two internal 2,2 Kb fragments of L1Md-A2 in an inverted 5'-3' orientation and was constructed in two steps : first, one fragment of L1Md-A2 (HincII (4211)-BamHI (6385))(21) with a Sall linker inserted in the HindIII site (5501) was cloned in the HincII-BamHI sites of pUC19 to generate pUCL1Md. Second, an identical L1Md-A2 fragment having an XhoI linker instead of Sall linker in the HindIII site (5501) was cloned in the SmaI-BamHI sites of pUCL1Md in an inverted 5'-3' orientation to create pL1-100. To construct pL1-85, an internal 2,0 Kb fragment, SspI (3995)-BamHI (6029) of rat LINE-1 element, L1Rn3 (22), was cloned in the SmaI-BamHI sites of pUCL1Md in an inverted 5'-3' orientation. The 3' exon of the *neo* gene (*neo3'*) (NotI-BamHI)

from pMC1neoInt was inserted in the BamHI site, between the two inverted LINE sequences, of both pL1-100 and pL1-85 to generate pL1-100neo and pL1-85neo. In the XhoI linker (5501) of L1Md-A2 and in the MscI site (4968) of L1Rn-3 in pL1-100 and pL1-85 respectively we inserted the I-SceI recognition site to generate pST100 and pST85 (Fig.1).

Cell lines and culture. The cell lines used in this study are : the thymidine kinase negative mouse cells (LTK⁻) (ATCC CCL 1.3), the human colorectal cancer cell lines SW480 (ATCC CCL 228) and HCT116 (ATCC CCL 247), and the human endometrial cancer cell line SKUT-1 (ATCC 114-HTB). DMEM, Leibovitz's L15, McCoy's and MEM media were used to grow LTK⁻, SW480, HCT116 and SKUT-1 cells respectively. All media were supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), gentamycin (Cellgro, 50 $\mu\text{g/ml}$) and fongizone (GIBCO-BRL, 250 $\mu\text{g/ml}$). All cultures were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator except for SW480 cells which were maintained without CO₂.

Transfection and drug selection. Transfection was done by electroporation. The optimal conditions of electroporation were determined for each human cell line by using the pGKpuro plasmid that confers resistance to puromycin. All cell lines were found to be better transfected at 950 μF and 250 V at room temperature. For recombination experiments, 3 to 5 x 10⁶ cells in 0,8 ml of culture medium without serum were electroporated in 0,4 cm cuvettes with 10 μg of pST100 or pST85 DNA mixed in less than 15 μl with 4 μg of

pGKpuro, or pAGO (an HSV-*TK* containing vector) for LTK⁻ cells, used as an internal control of electroporation efficiency. Before transfection of cells, pST100 and pST85 DNA preparations were analysed by restriction enzymes to make sure that recombination was not occurring in bacteria. All electroporations within a given experiment were carried out in parallel and with identical aliquots of the same pool of cells. The electroporated cells were incubated 10 min. at RT and then were plated in their corresponding medium. Fourty eight hours later the culture medium was replaced with a fresh one containing the corresponding drug for selection. Optimal concentrations of G418 (Geneticin, Gibco-BRL) and puromycin (Sigma) for selection were determined for each cell line. For LTK⁻ cells the HAT medium contains 100 μ M hypoxanthine, 0.4 μ M aminopterin and 16 μ M thymidine. The media were changed 2 to 3 times per week and the surviving colonies were fixed and stained 10 to 14 days later with 70% ethanol, 5% acetic acid, 3,7% formaldehyde and 1% crystal violet for 15 min and rinsed with water.

PCR-analysis of recombination products. Genomic DNA was prepared from isolated G418 resistant colonies and used as a template for PCR amplification. The primers *neo952* (5'-ccacgacgggcgttctctgcgag) and *neo1300* (5'-gtcagcagagatcctcgccgtc) were used to amplify parts of the two realigned *neo* exons and the intervening intron. PCR amplifications were carried out with the Expand High Fidelity PCR System kit (Boehringer Mannheim) in a thermal cycler for 30 cycles. The PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels followed by Southern blot hybridization (not shown).

RESULTS

Recombination in mammalian cells is normally investigated by using as recombination substrates selectable marker genes, such as the bacterial neomycin-resistance gene (*neo*) that confers resistance to G418 drug, or the Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-*TK*) genes that confer resistance to HAT drug to cells deficient in their endogenous *TK* gene (23). In this type of assays, recombination is constrained by demanding the coding integrity of the recombining sequences to remain intact. Recombination events that do not reconstitute a functional marker gene and that may arise from the recombination process per se (24-27), or from errors of correction of heteroduplexes with numerous mismatches (16), or both, would escape detection in these assays.

An exon-switch based recombination assay. We therefore examined the effect of sequence divergence on recombination in an assay system that uses introns as recombination substrates. Recombination between inverted intronic sequences (Fig.1) will realign two inverted selectable marker exons to generate a full length marker gene with a spliceable intron. Although this assay also relies on the use of a marker gene, recombination is confined to introns and hence there should be no major constraints on the recombination products obtained. During the development of this assay, a similar system was reported for use in yeast (10).

As intronic recombination substrates, we used LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Elements) repetitive sequences. These sequences exhibit various degrees of sequence homology (28) and their potential for recombination has been investigated in other studies (26, 29, 30). A synthetic intron was introduced into the coding

region of the *neo* gene such as to generate two artificial *neo* exons. In the recombination reporter plasmid pST100 (Fig. 1), the *neo* 3' exon (664 bp long) which contains the 3' end of the *neo* coding sequence and an acceptor splice site (AS), is placed between two inverted identical mouse LINE-1 (L1Md) fragments; whereas in the reporter plasmid pST85 (Fig. 1), the *neo* 3' exon is between one L1Md and one rat LINE-1 (L1Rn) fragment. L1Md (2,2 Kb) and L1Rn (2,0 Kb) fragments share 85% sequence identity throughout except for the 3'-end 300 bp where they share only 74% sequence identity (21, 22). Divergence between L1Md and L1Rn is fairly evenly distributed in the region of 85% sequence identity, with stretches of perfect sequence match being ≤ 44 bp. The *neo* 5' exon (533 bp long), which contains the 5' coding region of *neo* and a splice donor site (DS), was placed within the L1Md fragment in both plasmids (Fig.1). Cells transfected with either plasmid would be sensitive to G418 (G418^S) because the *neo* exons and the introns are positioned in inverted orientations such as to generate a non functional *neo* gene. Cells will become resistant to G418 (G418^R) only when recombination between the LINE-1 fragments will reorient the *neo* exons to generate a full length *neo* gene with a spliceable intron.

In preliminary experiments, we determined the intron length that can be positioned within the *neo* gene without affecting much its transfection efficiency (data not shown). One *neo* gene variant with a 884 bp LINE-1 fragment as intron was as efficient as the original *neo* gene, as demonstrated by

G418^R colony formation in mouse LTK⁻ cells (data not shown). We therefore choose to use this intron length to construct pST100 and pST85. A similar efficiency of LTK⁻ transfection was obtained when we flipped the *neo* 3' exon in the pST100 plasmid such as to mimic crossing-over events (data not shown). This indicated that *neo* recombinant molecules can be spliced out efficiently and thus should be detected in our assay.

Extrachromosomal recombination in MMR proficient mouse cells. As mouse LTK⁻ cells were used as a background during the development of the exon-switch based recombination assay, the effect of sequence divergence on recombination was tested first in these cells. LTK⁻ cells have been used on many occasions to determine the minimum length of homology required for efficient recombination in mammalian cells (23). As these cells also seem to be MMR proficient (31), their use will permit us to compare our results with those obtained by others (32) to validate the functionality of our assay. In parallel experiments, LTK⁻ cells were co-transfected either with the plasmid pAGO and circular pST100, or the pAGO and circular pST85. The plasmid pAGO contains the HSV-*TK* gene and thus would confer HAT resistance to LTK⁻ cells (33). Immediately after co-transfection, cells were split in two separate cultures, and forty-eight hours later, when plasmids had presumably recombined and integrated into the genome, we added HAT containing medium to one third of the co-transfected cells and G418 containing medium to the remaining two thirds. The inclusion of pAGO provided a convenient way for assessing transfection efficiency and normalizing recombination frequency data obtained

in different experiments. This allowed comparison of normalized recombination frequencies that were expressed as the number of G418^R colonies divided by the number of HAT^R colonies. Table 1 shows that circular pST85 recombined five-fold less efficiently than circular pST100. This is similar to the 3- to 15-fold decrease in the efficiency of extrachromosomal recombination between 19% diverged HSV-*TK* gene sequences in LTK⁻ cells (32).

Sequence divergence does not block DSB-induced recombination. To determine what is the effect of sequence divergence on recombinational repair of DSBs, LTK⁻ cells were transfected with linear pST100 and pST85 plasmids. DSBs were introduced at the unique I-SceI restriction site located in the middle of L1Rn and L1Md sequences of pST85 and pST100 respectively (Fig. 1). As shown in Table 1, pST85 recombined as efficiently as pST100, indicating that sequence divergence does not decrease the efficiency of DSB-induced recombination. In contrast, DSBs did not alleviate the 15-fold decrease in the efficiency of intermolecular or intramolecular plasmid recombination between 19% HSV-*TK* genes in LTK⁻ cells (32). The reason for this discrepancy between the results is not known but could be due to the fact that in our assay system there is less constraints on the recombinants than in the HSV-*TK* gene based assay (32).

Extrachromosomal recombination in MMR proficient human cells.

We repeated the experiments described above with the human carcinoma cell line SW480. This cell line is very well characterized as MMR proficient (34). Since SW480 cells are resistant to HAT (data not shown), we used for co-

transfection experiments the plasmid pGKpuro that confers resistance to puromycin. As shown in Table 2, circular pST85 recombined 6-fold less efficiently than pST100. In sharp contrast, linear pST85 recombined as efficiently as pST100 (Table 2). Tables 1 and 2 also show that the assay system generates more recombinants in mouse cells than in human cells. The reason behind this is not known but could be due either to suppression of plasmid recombination or inefficiency of intron splicing of the recombinant molecules in human cells (these hypotheses are under investigation). However, if one ignores this difference as cell line specific, the result is that in two MMR proficient cell lines from distinct species, 15% divergence lowers the recombination frequency by 5- to 6-fold with assay system (Table 1 and 2).

Recombination in MMR deficient cell lines. To determine whether diverged sequences can recombine as efficiently as identical sequences in a MMR deficient background, we introduced pST85 and pST100 in two human carcinoma cell lines HCT116 and SKUT-1 cells. The HCT116 cells are mutated in the *MLH1* gene (35), whereas SKUT-1 cells are defective in the *MSH2* gene (36, 37), and both have no detectable product from the corresponding genes, as determined by a Western blot analysis (data not shown). As shown in Table 2, pST85 recombined three-fold less than pST100 in HCT116 cells and only two-fold less in SKUT-1 cells (Table 2). This is significantly less than the 6-fold reduction observed in human MMR proficient SW480 cells (see statistical analysis and comparison of odds ratios in Table 2).

The two-fold reduction in recombination efficiency in SKUT-1 cells disappeared with linear plasmids (Table 2).

Analysis of G418^R colonies. To determine whether our assay can indeed rescue rearranged recombination intermediates, we carried out a PCR analysis of 66 G418^R colonies obtained with MMR proficient cells. We used amplimers that amplify the two realigned *neo* 3' and *neo* 5' exons with the intervening intron (Fig. 2A). Rearranged recombination intermediates would be expected to exhibit introns of different length when compared to precise recombinants with expected full length introns. Analysis of 32 SW480 G418^R colonies obtained with pST100 revealed that 78% (25/32) were precise recombinants with a full length intron and 22% (7/32) were rearranged recombinants with an intron of variable sizes (Fig. 2B). Out of 34 G418^R colonies (7 with LTK⁻ and 17 with SW480 cells) obtained with pST85, 50% (17/34) were of the precise type and 50% (17/34) were of the rearranged type. In the case of the 7 LTK⁻ G418^R colonies included in this analysis, 3 recombinants were of the precise type and 4 were of the rearranged type.

As shown in Fig. 2A, precise recombinants may arise either from conservative homologous recombination: gene conversion, associated or not with a crossing-over event, crossing-over, or non-conservative homologous recombination (not shown). Non-conservative recombination would necessitate the participation of two plasmid molecules and require a DSB in each plasmid molecule (20). However, the PCR analysis does not permit us to discriminate between these recombination events. A PCR fragment indicating a gene

conversion event, or a gene conversion associated with a crossing-over event (lanes 4 and 7), may in fact represent a non-conservative homologous recombination event. Similarly, a PCR fragment indicating a crossing-over event (lanes 5 and 8) may in fact represent a gene conversion event that has lost one of the *neo* 5' exons during integration of the recombinant molecule into the recipient genome. Discrimination between these events would require a PCR analysis with amplimers that are specific to plasmid sequences flanking the LINE-1 fragments. We did not carry out such an analysis because the sequences flanking the LINE-1 fragments may have been lost during the integration of recombinant molecules into the recipient genome.

DISCUSSION

We have examined the effect of sequence divergence on plasmid recombination and recombinational repair of plasmid-borne DSBs in MMR proficient and deficient cell lines. We measured recombination by using a strategy in which the selection employed is not constrained by demanding the coding integrity of the recombining sequences to remain intact. Sequence divergence of 15% decreased recombination by 5-fold in mouse LTK⁻ cells and 6-fold in human SW480 cells. This is similar to the 5- to 15-fold decrease in the efficiency of extrachromosomal recombination reported with the use of LTK⁻ cells and 19% diverged HSV-*TK* gene sequences (32). In contrast, the effect of sequence divergence on DSB-induced recombination appears to be different between the two studies (to be discussed below). In MMR deficient carcinoma cell lines HCT116 (*MLH1*^{-/-}) and SKUT-1 (*MSH2*^{-/-}), 15% sequence divergence decreased recombination by only 3- and 2-fold respectively. This is significantly less than the 6-fold decrease observed with MMR proficient cells, implying that the difference between diverged and identical sequences in these cells was mainly due to MMR. Similarly, in the yeast *S. cerevisiae*, mutation in *MSH2* or *PMS1* genes did not increase extrachromosomal homeologous recombination by more than two-fold (11, 12).

The MMR deficient cell lines we used are of a mutator phenotype, presumably unstable and when grown for many generations in culture will undoubtedly accumulate other defects. Thus, one may argue that the decrease in homeologous recombination we attributed to MMR may in fact be due to

other accumulated defects. Such defects may either affect the recombination process in general or recombination between diverged sequences specifically. The first type of defects would not discriminate between identical and diverged sequences and thus may not bear on our conclusion since identical and diverged sequences were compared within the same cell line rather than between cell lines. The second type of defects may affect proteins with mismatch recognition function. Beside MSH2, the only known mammalian protein with a similar function is the tumor suppressor p53. This protein can bind mismatched nucleotides in DNA heteroduplexes (38, 39) and it was therefore suggested that p53 could also inhibit recombination between diverged sequences (39). However, this possibility may also not bear on our conclusion. First, the 6-fold decrease in recombination frequency observed with MMR proficient SW480 cells would be still attributable to MMR function since the p53 gene is mutated in these cells (40). Second, the effect of sequence divergence on spontaneous recombination would be expected to increase in the wild type p53 HCT116 cells (41) relative to mutant p53 SW480 cells. Actually, we observed a decrease in the effect of sequence divergence on recombination with HCT116 cells rather than SW480 cells. Therefore, our results imply that the decrease in homeologous recombination we observed was through MMR.

There is an apparent difference between SKUT-1 and HCT116 cells, it appears that the *MLH1* deficient HCT116 cells overlap the wild type SW480 in the odds ratio (Table 2). This would suggest that MSH2 protein which is expressed in HCT116 cells (data not shown) inhibits recombination more

efficiently than MLH1 which is expressed in SKUT-1 cells (data not shown). This was found to be the case in the yeast *S. cerevisiae* (9). Previous studies have also indicated that *E. coli* MutS alone can abolish in vitro RecA-catalysed strand exchange reaction between diverged sequences (42), and the yeast MSH2 homologue can block branch migration of Holliday junctions through mismatches in meiotic recombination intermediates (12).

In contrast to spontaneous recombination, DSB-induced recombination does not seem to be decreased by sequence divergence and MMR activity. Linear pST85 (diverged sequences) recombined as efficiently as pST100 (identical sequences) in both MMR proficient and deficient cell lines. This indicates that either spontaneous recombination may not be initiated by DSBs or that MMR may interfere with spontaneous recombination before DSB formation. Spontaneous recombination may be initiated by single-strand nicks (17, 18) or through paranemic homologous pairing without invoking strand breaks (43, 44). DNA sequence divergence and MMR may inhibit spontaneous recombination by interfering with these processes. Notwithstanding the mechanisms that initiate recombination, our results indicate that the decrease in the efficiency of spontaneous recombination is due to interference of sequence divergence and MMR with initiation rather than later steps that lead to the production of rearranged recombination intermediates since such intermediates were readily detectable with the assay system we used. However, the fact that we observed two-fold more rearranged recombinants with diverged sequences than with identical sequences, MMR may have also affected the structure of

recombination intermediates (16, 29, 30). This hypothesis is under investigation.

While the results reported here and elsewhere (29, 30, 45) indicate that 15% sequence divergence does not decrease the efficiency of recombinational repair of DSBs, other studies have indicated that sequence divergence can lead to a dramatic decrease in the frequency of DSB-induced extrachromosomal recombination (32) or gene targeting (13). Bacterial conjugation is yet another example of DSB-induced episomal recombination that can be decreased by more than 1000-fold between 15% diverged sequences (5). The reason behind this discrepancy is not known but might be due to differences in the assay systems used. Some assays recover only functional (precise) recombinants, whereas in others (29, 30, this study) both precise and rearranged recombinants can be detected. An alternative explanation could be that in some assays there is the possibility for DSB repair to occur through a mechanism in which recombination requires only strand invasion by a 3' end that initiates replication (20, 26, 27, 29, 30, 45) (Fig. 3). On the other hand, gene targeting and bacterial conjugation would require in addition to strand invasion, Holliday junction formation/migration and its resolution into crossing-over events (Fig.3). These steps seem to be very sensitive to both sequence divergence and MMR proteins (12, 42, 46, 47) while recombination associated replication appears to be a very efficient mechanism for DSB repair between diverged sequences (26, 29, 30, 45).

While our results indicate an elevation of recombination between diverged DNA sequences in *msh2* and *mlh1* deficient human cells, no frequent

gross chromosomal rearrangements have been reported yet in this type of cells. However, since most reported diseases and cancers that are associated with recombination, including deletions, inversions, and duplications, between repetitive sequences are in the range of 3 to 16 kbp (48), it would not be surprising if such recombination events have escaped detection with cytological methods.

In summary, our results indicate that sequence divergence and MMR can discourage spontaneous recombination but not recombinational repair of DSBs. The differential sensitivity of these two processes to sequence divergence and MMR may play an important role in the stability of the mammalian genome by preventing recombination between endogenous repetitive sequences and by allowing an efficient repair of DSBs. Since DSBs, if not repaired, could be mutagenic or lethal to cells and homologous recombination appears to be a major mechanism of DSB repair in mammals (49), it would be advantageous to the cell to let repair proceed normally even between diverged sequences, especially as in these cells recombinational DSB repair occurs almost exclusively by gene conversion (50). MMR and probably other mechanisms such as methylation (51) may assist DSB repair such as to avoid Holliday junction formation and crossing-overs which are the source of genomic instability.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Drs Antonio Furano and Clyde A. Hutchison III for the generous gift of L1Rn-3 and L1Md-A2 elements respectively. We thank Shona Teijeiro for technical assistance and Dr. Lee Wall for helpful comments on the manuscript. This work was supported by a research grant from the National Cancer Institute of Canada and by a research scholar from the Medical Research Council-Cancer Research Society to A.B.

LITTERATURE CITED

1. Modrich, P., and Lahue, R. (1996). *Ann. Rev. Biochem.* **65**: 101-133.
2. Radman, M. (1991). *Biochimie* **73**, 357-361.
3. Buermeyer, A.B., Deschênes, S.M., Baker, S.M., and Liskay, M. (1999). *Ann. Rev. Genet.* **33**: 533-564.
4. Kolodner, R., and Marsischky, G.T. (1999). *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 89-96.
5. Rayssiguier, C., Thaler, D.S., and Radman, M. (1989). *Nature* **342**: 396-400.
6. Selva, E.M., New, L, Crouse, G.F., and Lahue, R.S. (1995). *Genetics* **139**: 1175-1188.
7. Chamber, S.R., Hunter, N., Louis, E.J., and Borts, R.H. (1996). *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6110-6120.
8. Datta, A., Hendrix, M., Lipsitch, M., and Jinks-Robertson, S. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 9757-9762.
9. Nicholson, A., Hendrix, M., Jinks-Robertson, and G.F., Crouse. (2000). *Genetics* **154**: 133-146.
10. Datta, A., Adjiri, A., New, L., Crouse, G.F., and Jinks-Robertson, S. (1996). *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1085-1093.
11. Porter, G., Westmoreland, J., Priebe, S., and Resnick, M.A. (1996). *Genetics* **143**: 755-767.
12. Alani, E., Reenan, R.A.G., and Kolodner, R.D. (1994). *Genetics* **137**: 19-39.

13. deWind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., and teRiel, H. (1995). *Cell* **82**: 321-330
14. Ciotta, C., Ceccotti, S., Aquilina, G., Humbert, O., Palombo, F., Jiricny, J., Bignami, M., and Yahiv, M. (1998). *J. Mol. Biol.* **276**: 705-719.
15. Morrison, C., and Wagner, E. (1996). *Nucleic Acids Res.* **24**: 2053-2058
16. Radman, M. (1988). In : *Genetic Recombination*. (eds. Kucherlapati, R. and Smith, G.R.), pp. 169. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
17. Holliday, R. (1964). *Genet. Res.* **5**: 282-304.
18. Meselson, M.S., and Radding, C.M. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **72**: 358-361
19. Szostak, J.W., and Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983). *Cell* **33**: 25-35.
20. Belmaaza, A., and Chartrand, P. (1994). *Mutat Res* **314**: 199-208.
21. Loeb, D.D., Padgett, P.W., Hardies, S.C., Shehee, W.D., Comer, M.B., Edgell, M.H., and Hutchison, C.A. III. (1986). *Mol Cell. Biol.* **6**: 168-182.
22. D'Ambrosio, E., Waitzkin, S.D., Salemme, F.R., and Furano, A.V. (1986). *Mol. Cell. Biol.* **6**: 411-424.
23. Bollag, R.J., Waldman, A.S., and Liskay, R.M. (1989). Homologous recombination in mammalian cells. *Ann. Rev. Genet.* **23** :199-225.
24. Puchta, H., Dujon, B., and Hohn, B. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 5055-5060.

25. Orr-Weaver, T.L., and J.W. Szostak (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 4417-4421.
26. Belmaaza, A., Wallenburg, J.C., Brouillette, S., Gusew, N., and Chartrand, P. (1990). *Nucleic Acid. Res.* **18**: 6385-6391.
27. Adair, G.M., Scheerer, J.B., Brotherman, A., McConville, Wilson, J.H., and Rodney, S. Nairn. (1998). *Somat. Cell Mol. Genet.* **24**: 91-105.
28. Hutchison, C.A. III, Harides, S.C., Loeb, D.D., Shehee, W.R., and Edgell, M.H. (1989). In: *Mobile DNA*. (eds. Howe, M., and Berg, P.), pp. 593-617. ASM Press, Washington, D.C.
29. Belmaaza, A., Milot, E., Villemure, J.-F., and Chartrand, P. (1994). *EMBO J* **13**: 5355-5360.
30. Villemure, J.-F., Belmaaza, A., and Chartrand, P. (1997). *Mol. Gen. Genet.* **256**: 533-538.
31. Lukacsovich, T., and Waldman, A.S. (1999). *Genetics* **151**: 1559-1568.
32. Waldman, A.S., and Liskay, M.R. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **84**: 5340-5344
33. Colbere-Garapin, F., Chousterman, S., Horodniceanu, F., Kourilsky, P., and Garapin, A.C. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **76**: 3755-3759.
34. Parson, R., Li, G.-M., Longley, M.J., Fang, W., Papadopoulos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Modrich, P. (1993). *Cell* **75**: 1227-1236.

35. Koi, M., Umar, A., Chauhan, D.P., Cherian, S.P., Carethers, J.M., Kunkel, T.A., and Boland, C.R. (1994). *Cancer Res.* **54**: 4308-4312.
36. Risinger, J.I, Umar, A., Boyer, J.C., Evans, A.C., Berchuck, A., Kunkel, T.A., and Barrett, J.C. (1995). *Cancer Res.* **55**: 5664-5669.
37. Richards, B., Zhang, H., Phear, G., and Meuth, M. (1997). *Science* **277**: 1523-1526.
38. Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A.J., and Griffith, J. (1995). *Cell* **81**: 1013-1020.
39. Dudenhöffer, C., Rohaly, G., Will, K., Deppert, W., and Wiesmüller, L. (1998). *Mol. Cell. Biol.* **18**: 5332-5342.
40. Cottu, P.H., Muzeau, F., Estreicher, A., Fléjou, J.F., Iggo, R., Thomas, G., and Hamelin, R. (1996). *Oncogene* **13**: 2727-2730.
41. Gupta, M., Fan, S., Zhan, Q., Kohn, K.W., O'Connor, P.M., and Pommier, Y. (1997). *Clin. Cancer Res.* **3**: 1653-1660.
42. Worth, L.Jr., Clark, S., Radman, M., and Modrich, P. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 3238-3241.
43. Wilson, J.H. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 3641-3645.
44. Moore, S.P., Rich, A., and Fishel, R. (1988). *Genome* **31**: 45-52.
45. Priebe, S.D., Westmoreland, J., Nilsson-Tillgren, T., and Resnick, M.A. (1994). *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4802-4814.
46. DasGupta, C., and Radding, C.M. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 762-766.
47. Panyutin, I.G., and Hsieh, P. (1993). *J. Mol. Biol.* **230**: 413-424.

48. Labuda, D, Zietkiewicz, E., and Mitchell, G.A. (1995). In: *The impact of short interspersed elements (SINEs) on the host genome*. (ed. Maraia, R. J.), pp.1-24. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
49. Liang, F., Han, M., Romanienko, P.J., and Jasin, M. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 5172-5177.
50. Taghian, D.G., and Nickoloff, J.A. (1997). **17**: 6386-6393.
51. Maloisel, L., and Rossignol, J.L. (1998). *Genes Dev.* **12**: 1381-1389.
52. Fleiss, J. (1981). In: *Statistical methods for rates and proportions* (2nd edition) (eds. Wiley, J., and Sons), pp. 165- New York.

Figure legends

Fig. 1. Recombination reporter plasmids pST100 and pST85. Arrows indicate the 5' to 3' orientation of the LINE-1 (L1Md and L1Rn) fragments and the *neo* exons (see text for a detailed description of the plasmids).

Fig. 2. PCR-analysis of G418^R colonies

(A) A schematic representation of recombinant molecules.

(B) PCR-analysis was carried out by using primers specific to *neo5'* and *neo3'* exons such that the aligned *neo* exons in the recombinants will yield a fragment of 1.3 kbp diagnostic of crossing-over events (lanes 5 and 8) and fragments of 1.3 kbp and 2.5 kbp for gene conversion events, or gene conversion events associated with crossing-overs (lanes 4 and 7)(see panel A). Lanes 1 and 12: molecular weight standards (from bottom to top in kb : 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 to 8), lane 2: pST100/CO that mimics a crossing-over event is used as a positive control, lanes 3 and 6: pST100 and pST85 parental plasmids used as negative controls, lanes 4 and 5: pST100 recombinants, lanes 7 and 8 : pST85 recombinants, lanes 9 to 11 represent imprecise recombinants with introns shorter than 1.3 kbp.

Fig. 3. Proposed mechanisms for recombinational repair of DSBs with or without Holliday junction formation and branch migration. Steps a, b, c, d represent recombinational repair of a DSB when both broken ends are available for recombination. Either 3' end at the break can invade the homologous template and prime DNA synthesis (a, b). The recombination intermediate with an extended D-loop (b) can be resolved in two ways. Resolution can occur by

unwinding of the newly synthesized strand followed by annealing with the non-invading end of the broken molecule (c). Resolution can also occur by cutting at the front end of the D-loop (arrow in step b) and subsequent annealing with the non-invading strand. DNA synthesis and ligation will generate a Holliday junction that can migrate in either direction (d). Steps a' and b' illustrate recombination when only one end is available at a DSB (i.e. conjugation in bacteria). Either strand (3' or 5') can invade the intact homologous template (a'). In either case, markers (black boxes in a' and b') can be transferred to the intact recipient duplex only when Holliday junction formation and migration occur (b'). This type of recombination including gene targeting events that require Holliday junction formation and branch migration (d and b') would be more affected by DNA sequence divergence and MMR enzymes than either b or c (see text).

Table 1. Extrachromosomal recombination in mouse LTK⁻ cells.

Plasmids	G418 ^R colonies	HAT ^R colonies	Frequency of recombination	Ratio pST100 : pST85
pST100	336	729	46.0%	4.9 : 1
pST85	50	525	9.5%	
pST100/SceI	260	246	105%	1.3 : 1
pST85/SceI	261	330	78%	

Experiments were done in triplicate for either circular or linear (I-SceI digested) pST100 and pST85.

Table 2. Effect of sequence divergence and MMR on recombination in human cells.

Cell lines	Experiments ^a	G418 ^R colonies	Puro ^R colonies	Frequency of recombination ^b	Odds Ratio ^c (confidence interval)
SW480 (MR ⁺)	6				
pST100		76	1250	6.08%	5.5
pST85		16	1419	1.13%	(3.2 - 9.5)
pST100/SceI	4	26	323	8.05%	0.9
pST85/SceI		36	404	8.91%	(0.8 - 1.0)
HCT116 (<i>MLH1</i> ⁻)	8				
pST100		65	5911	1.10%	3.3
pST85		22	6639	0.33%	(2.0 - 5.3)
SKUT-1 (<i>MSH2</i> ⁻)	2				
pST100		48	3681	1.30%	1.9
pST85		33	4729	0.70%	(1.2 - 2.9)
pST100/SceI	2	44	4072	1.08%	1.5
pST85/SceI		24	3292	0.73%	(1.3 - 1.7)

^a Each experiment represents more than five electroporations done with each plasmid.

^b The difference in recombination frequencies between circular pST100 and pST85 in each cell line is statistically highly significant by Khi-square test with $P \ll 0.005$ for SW480 and HCT116, and $P = 0.0047$ for SKUT-1. The difference in DSB induced recombination frequencies is not statistically significant by Khi-square test with $P = 0.68$ for SW480 and $P = 0.075$ for SKUT-1.

^c Odds ratio and confidence interval were calculated according to Fleiss (52).

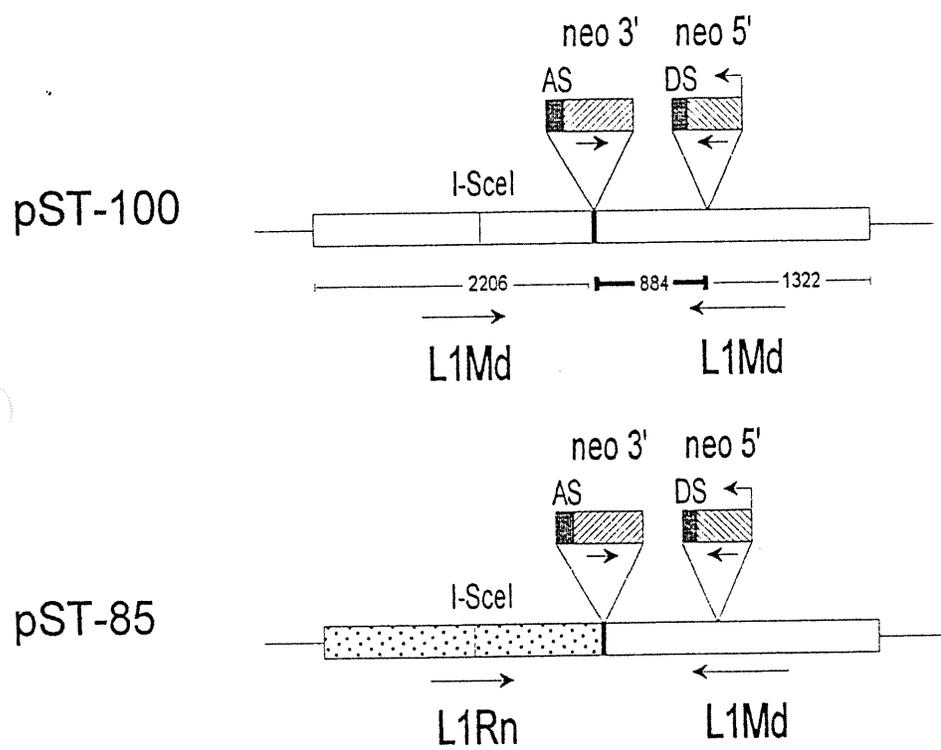


Figure 1

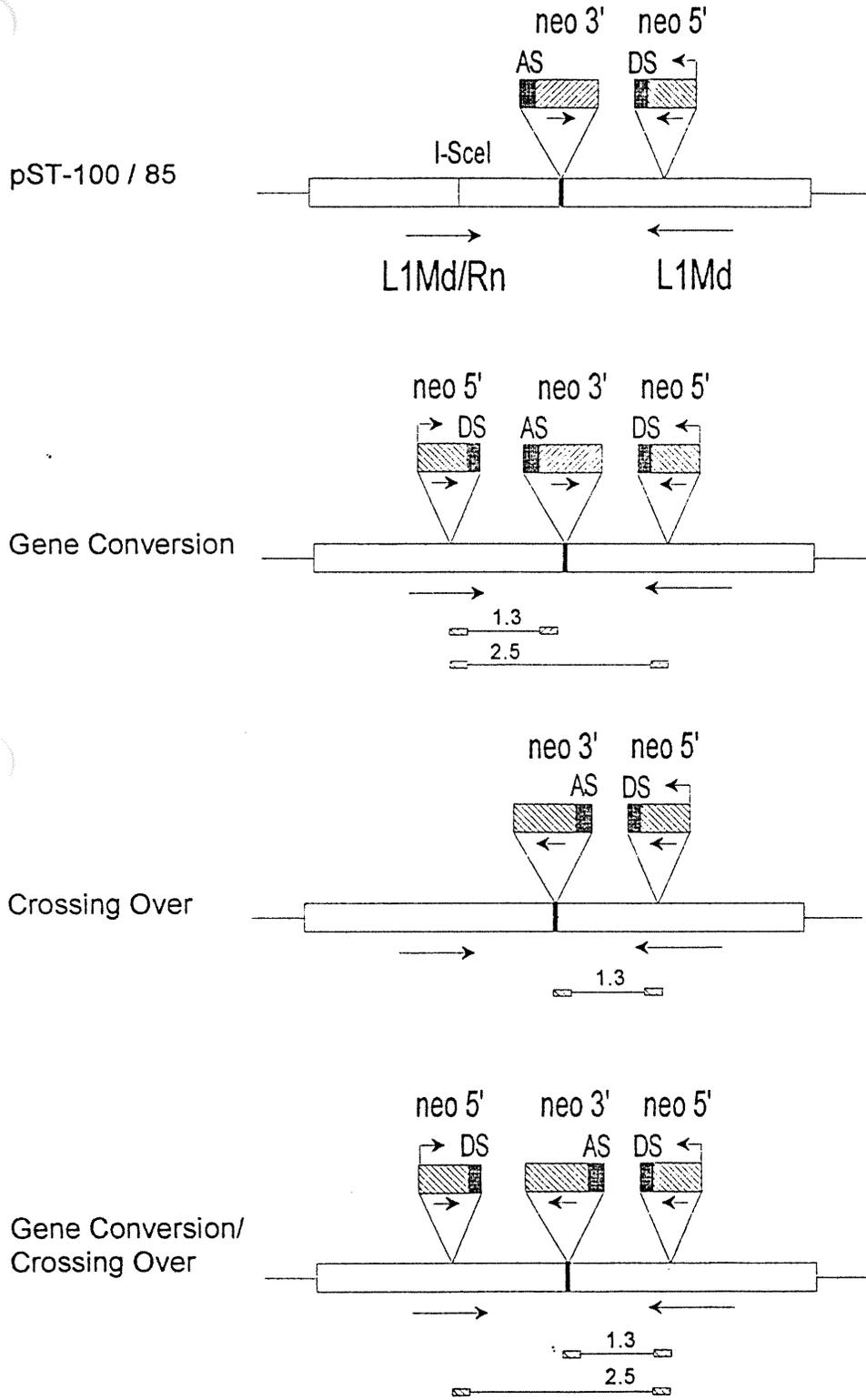


Figure 2A

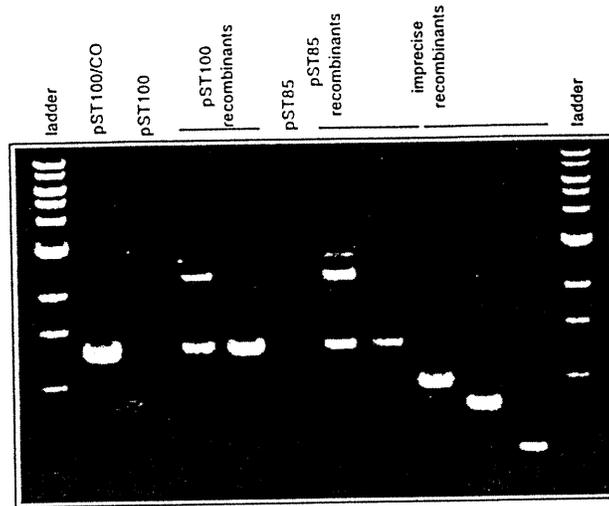


Figure 2B

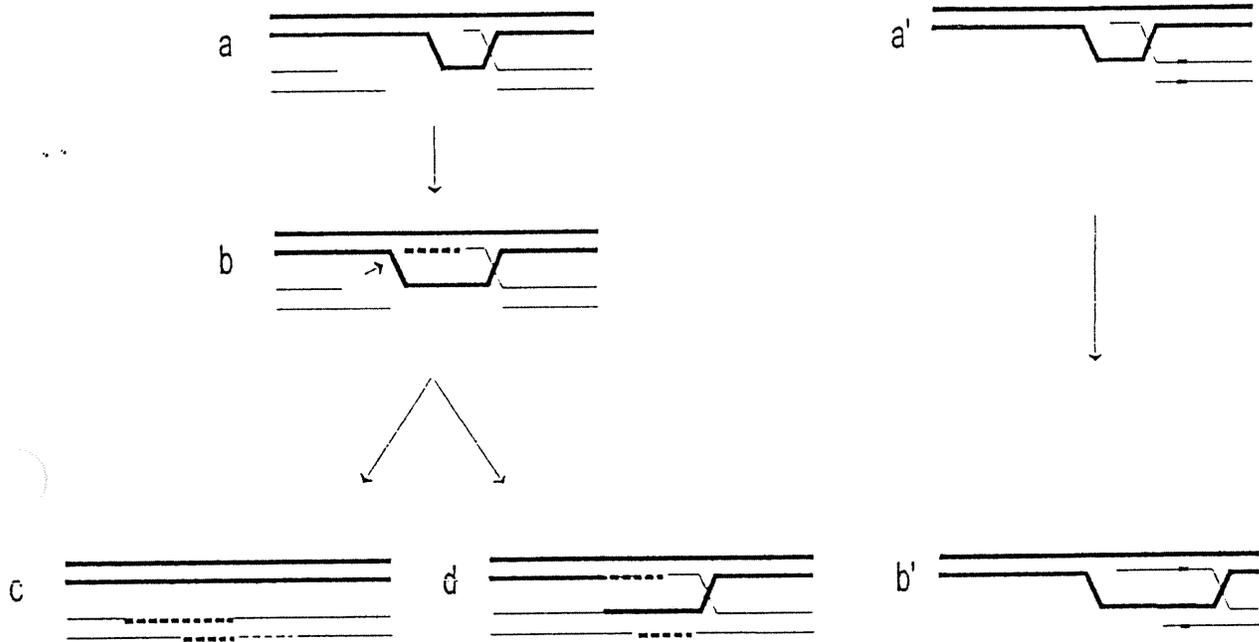


Figure 3

ANNEXE II

Chromatin insulators and matrix/scaffold attachment regions can protect a transgene from the negative effect of an adjacent promoter

Josée-France Villemure, and Abdellah Belmaaza*

Molecular Biology Program and Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal. Centre de Recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame, Institut du Cancer de Montréal, 1560 Sherbrooke est, J.A. de Sève, Y-4612, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1

*To whom correspondence should be addressed : Abdellah Belmaaza, CRCHUM/ICM, 1560 Sherbrooke Est, J.A. de Sève, Y-4612, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1



Running title: Insulation against repressive promoters

SUMMARY

Chromatin insulators and matrix/scaffold attachment regions (M/SARs) are DNA elements that protect against chromosomal position effects when placed on both sides of a transgene, and that block enhancers from activating promoters when they are placed between these two entities. It is therefore believed that these elements organize chromosomes into domains that act independent of one another. Previously, it has also been shown that two adjacent promoters can repress one another when they lie in tandem. Inserting a transcription terminator between two promoters can block repression of one promoter by an upstream promoter. Here, we show that repression of a promoter by a second promoter downstream of it can be prevented by inserting between the two promoters the insulator element of the chicken β -globin gene locus, the M/SAR element of the chicken lysozyme gene locus, or the core-unwinding element of M/SARs. This suggests that chromatin insulators and M/SARs can prevent interactions between adjacent transcription units. These results also suggest that under certain circumstances M/SARs act like insulators and they best support some kind of propagation model for insulation but they do not negate other models.

Abbreviations : M/SAR : matrix/scaffold attachment region, 5'HS4 : The 5' hypersensitive site 4, HSV-*tk* : Herpes simplex virus thymidine kinase gene, Pol2 : polymerase 2 gene, CMV : cytomegalovirus, sMAR : synthetic MAR element, cMAR : MAR element of the chicken lysozyme gene locus, *neo* : neomycine gene, IRES : internal ribosomal entry site, HAT : hypoxanthine aminopterin thymidine, GANC. : ganciclovir

INTRODUCTION

It is believed that eukaryotic chromosomes are organized into a series of discrete higher-order chromatin domains, with each domain defining a functionally autonomous unit of gene expression (reviewed in 1). Such an organization implies the existence of topological barriers flanking each domain that would protect transcription units from being influenced by regulatory elements located in adjacent domain (1).

DNA elements with the properties of topological barriers, which are also called domain boundaries or chromatin insulators, have been identified (reviewed in 2-5). The best characterized are the *scs* and *scs'* elements of *Drosophila 87A1 hsp 70* locus (6-8), the cluster of binding sites for the *Drosophila* suppressor of Hairy-wing protein of the *gypsy* retrotransposon (9, 10), and the 5' hypersensitive site 4 (5'HS4) of the chicken β -globin gene locus control region (LCR) (11-13). These elements were identified as chromatin insulators by their ability to prevent enhancers from activating adjacent promoters when they are placed between the two entities, and their ability to prevent chromosomal position effects (enhancement or repression) when they are flanking both sides of a transgene (2-5). These elements share no sequence identity with one another. They are neutral, they exhibit no transcription enhancing or silencing activities of their own and they do not affect the function of promoters. Although insulators may contain binding sites for transcription factors, they do not behave as classical promoters (2-5).

The matrix/scaffold attachment region (M/SAR) is another type of DNA element that might separate chromatin into domains of independent gene activity. Such sequences were initially identified by their ability to associate with the nuclear matrix or scaffold (reviewed in 14), a property that is not necessarily possessed by insulator elements (but see 15). M/SAR sequences are very AT-rich and exhibit certain structural features of non-B DNA, such as narrow minor grooves, DNA bends and a propensity to unwind (14, 16). These features are important for the structural role of M/SARs in dividing chromatin into topologically looped domains (14, 16). The frequent close association of M/SARs with transcription units and regulatory sequences, and the ability of M/SARs to protect transgenes from position effects have further

reinforced the potential importance of M/SARs in physically defining chromosomal regulatory looped domains (14).

Transgene repression, which is the usual outcome of chromosomal position effects, may result from integration of transgenes in heterochromatin or an inappropriate interaction between transgenes and adjacent regulatory elements (17, 18). Chromatin insulators that protect against chromosomal position effects do not seem to protect transgenes against repression from heterochromatin (6) or from adjacent regulatory elements such as transcription silencer (19). However, another regulatory element that may also impact a negative effect onto an adjacent transgene is a promoter. Previously, it has been shown that two adjacent promoters can repress one another when they lie in tandem (20-29). The mechanism by which one promoter represses a downstream promoter is known as 'promoter occlusion' in studies of prokaryote (20), or 'transcriptional interference' in studies of eukaryote (21). Such a mechanism has been attributed to read-through transcription, since a transcription termination site can prevent this repression when it is interposed between the two adjacent promoters (21, 22, 25). On the other hand, the mechanism by which a 3' promoter represses a 5' promoter has been termed 'promoter suppression' (27-29). It is associated with a modification of chromatin structure, which, it is thought, might be due to transcription-induced DNA topology (29).

In the present study, we investigated whether M/SARs and chromatin insulators have the ability to block promoter suppression. We found that suppression of the 5' HSV-*tk* gene by the 3' polymerase II gene (Pol2) promoter can be prevented by inserting between these two the chicken insulator 5'HS4, the M/SAR element of the chicken lysozyme gene locus (30, 31), or the core-unwinding element of M/SAR (16).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Constructions of Plasmids. The DNA constructs, schematically illustrated in Figures 1 and 5, were constructed from pJF-1 (Fig. 1). The pJF-1 plasmid was initially constructed by inserting the HSV-*tk* gene, as a 2,0 kbp PvuII fragment from the plasmid pAGO (32), between two inverted copies of an internal 3,0 kbp LINE-1 fragment (33) that was previously cloned in pUC19 (34). At the HincII site of the LINE-1 fragment situated upstream of the HSV-*tk* gene (Fig. 1) we inserted the IRES-*neo*, which contains the internal ribosomal entry site (IRES) linked to a promoter-less neomycin-resistance gene (*neo*), as a XbaI-Nhe I fragment derived from the plasmid pL1Zin (35; kindly provided by Dr. I. Ghattas). The pJF-2 plasmid was constructed from pJF-1 by inserting the short RNA polymerase II gene (Pol2) promoter (36; kindly provided by Dr. A. Bradley), as a SalI-SalI PCR fragment, in a unique SalI site within the LINE-1 fragment situated downstream of the HSV-*tk* gene (Fig. 1). The pJF-2flip plasmid was constructed by flipping an internal XbaI fragment of pJF-2 containing the IRES-*neo* and the pUC19 sequences such that the Pol2 promoter drives the expression of IRES-*neo* (Fig. 1). The plasmid pJF-3 was constructed by replacing the Pol2 promoter in pJF-2flip with the CMV promoter; the latter was from the plasmid pCMV (Clontech). The plasmid pJF-2flipcMAR was constructed by inserting the MAR element of the chicken lysozyme gene (cMAR) (30, 31; kindly provided by Dr. WH. Strätling) as a 3.0 kbp XbaI fragment in a BstEII restriction situated between the 3' end of the HSV-*tk* gene and the LINE-1 sequences of pJF-2flip (fig.5). To construct pJF-2flipcHS4 we inserted the insulator 5'HS4 element of the chicken β -globin LCR, as a 1.2 kbp XbaI fragment derived from the plasmid pJC5-4 (11; kindly provided by Dr. G. Felsenfeld) in the BstEII site of pJF-2flip. The plasmid pJF-2flipsMAR was constructed by inserting the synthetic MAR element (sMAR), as a 175 bp BamHI-SalI fragment from the plasmid pAGlu (16; kindly provided by Dr. T. Kohwi-Shigematsu) in the BstEII site of pJF-2flip.

Cell culture and transfection. Mouse *Ltk-* cells were maintained in DMEM, whereas K562 erythroleukemia cells were maintained in improved minimal essential medium; both mediums were supplemented with 10% calf serum. Transfection of cells was done by electroporation as

previously described (11). Selection and propagation of HSV-*tk* gene expressing cells were performed in HAT medium (100 μ M hypoxanthine, 0.4 μ M aminopterin, and 16 μ M thymidine). Selection against the expression of HSV-*tk* gene was performed in medium supplemented with 1.5 μ g/ml of Ganciclovir (Syntex). Selection and propagation of *neo*-expressing cells were performed with 400 μ g/ml of G418 containing medium in the case of *Ltk*- cells, and 500-1000 μ g/ml of G418 in the case of K562 cells. Plating efficiencies were determined by counting the cells and re-plating them in the appropriate medium. When cells were switched from HAT to either a selective or a non-selective medium, hypoxanthine and thymidine were added to the medium for the initial week of growth.

Manipulation of Nucleic Acids. Cellular DNA and RNA were isolated and analysed by standard methods. Cellular DNA (15 μ g) digested with restriction enzyme or poly(A)+ RNA (5 μ g) were subjected to gel electrophoresis and blotted for hybridization with HSV-*tk* sequences. The probes were labelled with (α -³²P)dCTP using the random primed DNA labelling kit (Boehringer Mannheim).

Nuclei isolation and digestion with EcoRI enzyme. This procedure was carried out as previously described (37).

RESULTS

Promoter suppression and transcriptional interference. Promoter suppression and/or transcriptional interference can occur with a variety of reporter genes and promoters (20-29). Here we used the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-*tk*) gene with its own promoter as a transgene. Cells (*tk*-) expressing the HSV-*tk* gene are resistant to the drug HAT but they are sensitive to the drug Ganciclovir (GANC), while; conversly, cells not expressing the HSV-*tk* gene are sensitive to HAT but they are resistant to GANC. Hence, the use of the HSV-*tk* gene allows for both positive and negative selection. To investigate promoter suppression/interference we placed the mouse RNA polymerase II gene (Pol2) promoter, or the cytomegalovirus (CMV) promoter, adjacent to the HSV-*tk* gene (Fig.1).

The plasmids (Fig. 1) also contain, in addition to the HSV-*tk* gene and the adjacent promoter, a promoter-less neomycin (*neo*) gene which, when active, confers G418 drug resistance to cells. Moreover, as these plasmids were originally designed to study homologous recombination they all also contain two inverted copies of a transcriptionally inactive LINE-1 sequence flanking the HSV-*tk* gene (Fig.1). These additional sequences had no effect on gene expression related to the present study (see below).

When mouse *Ltk*- cells were transfected in parallel with linear pJF-1, pJF-2, pJF-2flip and pJF-3 (Fig.1) and then plated in HAT containing medium, pJF-1 gave on average 10-fold more HAT resistant (HAT^R) colonies than either pJF-2, pJF-2flip or pJF-3 (Fig. 1). This result was not due to a variation in the transfection efficiency, as each plasmid was co-transfected with circular pGKpuro and an equal number of puromycin resistant (PURO^R) colonies were obtained in each case. The lower efficiency of the HSV-*tk* gene in pJF-2, pJF-2flip or pJF-3 also could not be ascribed to a transcription silencing element that has been reported to be contained within the coding region of *neo* (38, 39), or to the inverted LINE-1 sequences, as these elements were also present in the pJF-1 plasmid (Fig.1). Moreover, the LINE-1 sequences and the coding region of *neo* did not interfere with the expression of the HSV-*tk* gene, as pJF-1 transfected into *Ltk*- cells produced the same number of HAT^R colonies as the plasmid pAGO, which is a bacterial plasmid

containing only the HSV-*tk* gene (32) (data not shown). The only constant difference between pJF-1 and the other three plasmids is that the three plasmids contain a promoter, either the Pol2 or the CMV promoter, in addition to the HSV-*tk* gene (Fig. 1). We therefore concluded that the second promoter suppressed the HSV-*tk* gene in pJF-2, pJF-3 and pJF-2flip plasmids.

To further analyse the interaction between the HSV-*tk* gene and the adjacent Pol2 promoter we used the plasmid pJF-2flip. Unlike pJF-2, pJF-2flip can potentially transform *Ltk*-cells to both HAT^R and G418^R phenotypes since the Pol2 promoter, in this case, is linked to the *neo* gene (Fig. 1). We therefore determined whether individual cell clones selected in HAT could also grow in the presence of G418 and vice versa. The use of cell clones with single-copy integration events was deemed necessary to eliminate problems associated with the silencing of multiple transgene copies in an array (40). Fourteen HAT^R and 14 G418^R independent clones with an intact single-copy of pJF-2flip were grown in HAT medium and G418 medium separately and the plating efficiency of each clone was determined. The plating efficiency was defined as the number of cells that grew when re-plated in the second drug selection regime divided by the number of cells that grew when the cells were re-plated in the original drug selection regime. Nine out of 14 pJF-2flip-transfected cell clones that had initially been selected for HAT resistance did not grow when subsequently placed in G418 medium (Table 1). Similarly, 8 out of 14 cell clones that had initially been selected for G418 resistance did not grow when subsequently placed in HAT medium. In both cases, the remaining cell clones, except for two, had a plating efficiency of only 1% to 30% when subsequently grown in the second drug regime (Table 1). Thus, in 26 out of 28 clones initially selected for a phenotype that is determined by expression of one gene, the expression of the adjacent gene was suppressed. We therefore concluded that both promoter suppression and transcriptional interference were occurring in pJF-2flip-transfected cell clones.

Previously, it has been shown that transcriptional interference and promoter suppression are heritable phenomena. In addition, promoter suppression is epigenetic, reversible and

involves modification of chromatin structure (27-29). The results presented below support these studies.

Silencing of linked genes is heritable. We determined whether promoter suppression and transcriptional interference could be maintained without continued selection. We took 10 HAT^R and 10 G418^R clones that were sensitive to the other drug (Table 1), diluted them to 10-100 cells, grew them up to 10⁵ cells without selection, and then re-tested them in the presence of the drugs. We obtained results similar to those presented in Table 1. All clones that had been initially selected as G418^R were still G418^R but not HAT^R, and clones initially selected as HAT^R were still HAT^R but not G418^R. Freezing and thawing gave similar results. This indicated that both suppression and interference are heritable phenomena.

Suppression of the HSV-*tk* gene is epigenetic and reversible. Suppression of the HSV-*tk* gene in G418^R clones that did not grow in HAT could result either from a genetic event or an epigenetic event. To differentiate between these two possibilities, we recovered the HSV-*tk* gene from the genome of these colonies by plasmid rescue in bacteria and determined its biological activity. If suppression were the result of mutations that had crippled the gene or inactivated its promoter, then the recovered HSV-*tk* gene would not have had the ability to confer HAT resistance to newly transfected *Ltk*- cells. If, on the other hand, suppression of the HSV-*tk* gene had been the result of an epigenetic event, then the recovered HSV-*tk* gene should have been able to confer HAT resistance. The HSV-*tk* gene recovered from four G418^R colonies in which no cells would grow in HAT containing medium transformed *Ltk*- cells to HAT^R phenotype as efficiently as the wild type gene (data not shown). The reversal of the suppressed HSV-*tk* gene to the active state can also occur during cell passages. Cells from cell clones that were initially selected as G418^R but could not grow in HAT medium can switch to being HAT^R cell clones at a variable frequency (Table 1). This indicates that suppression of the HSV-*tk* gene is epigenetic and reversible.

Suppression of the HSV-*tk* gene occurred at the transcription level. To determine whether suppression of the HSV-*tk* gene occurred at the transcription level, poly (A)+ RNA isolated from

G418^R cell clones that did not grow in HAT containing medium was analysed by hybridization using the HSV-*tk* gene as a probe. This revealed that while HAT^R cell clones had the expected 1,300-nucleotide HSV-*tk* mRNA (41), this transcript was almost absent in the G418^R clones analysed (Fig. 2). The HSV-*tk* gene recovered from these non-expressing cell clones was not mutated as it conferred HAT resistance to newly transfected *Ltk*- cells (see above). This indicated that the HSV-*tk* gene was being regulated at the transcription level.

Suppression of the HSV-*tk* gene correlates with a less accessible chromatin. Previous studies have shown that promoter suppression was associated with chromatin inaccessibility, as revealed by DNase I treatment (29). The HSV-*tk* gene promoter, when active, is contained entirely within a nuclease sensitive region containing some hypersensitive sites (37). One of the hypersensitive sites coincides with a unique EcoRI restriction site in the promoter region. We choose this site as an indicator of chromatin structure over the HSV-*tk* gene promoter in expressing and non-expressing cell clones. To analyse chromatin structure at identical integration sites, we used parental cell clones that could not grow in HAT as HSV-*tk* non-expressing cells and revertants that could grow in HAT as HSV-*tk* expressing cell clones. Intact nuclei were isolated from cell clones and digested with EcoRI. Proteins were removed with proteinase K treatment and the DNA was digested with SmaI and XhoI restriction enzymes to release a DNA fragment that contains the HSV-*tk* gene sequences. If EcoRI cuts efficiently in nuclei a SmaI-EcoRI fragment will be generated. As seen in Fig. 3, the EcoRI site in expressing cells was cut efficiently in comparison to cells not expressing the HSV-*tk* gene.

The insensitivity of the HSV-*tk* gene promoter to EcoRI in intact nuclei of HAT sensitive cell clones could be due to DNA methylation. For example, it has been reported that methylation of the cytosine residue adjacent to the EcoRI restriction site in the HSV-*tk* gene promoter can prevent cleavage of that site (42). We found that this was not the case as purified genomic DNA from the above cell clones not expressing the HSV-*tk* gene was digested efficiently with EcoRI (Fig. 3, lane 4). These results indicate that the HSV-*tk* gene promoter may be contained within inaccessible chromatin in these cells.

The suppressed HSV-*tk* gene can be activated by a histone deacetylase inhibitor.

Inaccessible chromatin has been associated with deacetylated histones and the regulation of its structure and transcription activity has been linked to reversible acetylation of the amino termini of core histones (43). Addition of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A, TSA, to cultured cells can re-activate suppressed reporter genes (44, 45). Thus, we treated G418^R clones that did not express the HSV-*tk* gene with various concentrations of TSA. Activation of the HSV-*tk* gene was scored as an increase in the number of HAT^R colonies. Cells were grown in G418-free medium containing TSA for twenty-four hours, followed by forty-eight hours of recovery, and then the cells were subjected to HAT selection. TSA treatment produced a significant activation of the HSV-*tk* gene (Fig. 4). This specific deacetylase inhibitor did not stimulate the HSV-*tk* gene already expressed in HAT^R clones (data not shown). These results suggest that histone deacetylation was involved in the suppression of the HSV-*tk* gene.

M/SAR can protect against promoter suppression. We tested whether M/SAR elements could insulate the HSV-*tk* gene from the negative effect of the adjacent Pol2 promoter. We tested the M/SAR element of the chicken lysozyme gene locus (cMAR; 30, 31) and a synthetic M/SAR element (sMAR; 16). The latter is a concatemer of an oligonucleotide containing an unwinding site (AATATATTT) found in M/SAR elements at an elevated frequency (16, 46). The AT-rich core-unwinding site can relieve negative superhelical strain by becoming stably base unpaired. Its multimerization is necessary for high affinity binding to the nuclear matrix/scaffold (16). Constructs containing the M/SAR elements were transfected into *Ltk*- cells in parallel with pJF-2flip, pJF-2 and pJF-1. The number of HAT^R colonies obtained with pJF-2flip/2sMAR, in which the synthetic sMAR element was positioned upstream of the HSV-*tk* gene and downstream of the *neo* gene was nearly as low as that obtained with pJF-2, or pJF-2flip (Fig. 5). Hence, the sMAR had no effect in this case. In contrast, the number of HAT^R colonies obtained with pJF-2flip in which either M/SAR element was interposed between the HSV-*tk* gene and the Pol2 promoter was nearly as high as that obtained with pJF-1 (Fig. 5). Thus, in these cases, suppression of the HSV-*tk* gene by the Pol2 promoter was blocked by M/SARs. The block to promoter suppression

was not due to the increased distance between the HSV-*tk* gene and the Pol2 promoter since an insert of an equal size (a 2,5 kbp fragment, pJF-2flipL) to the cMAR element did not reduce suppression of the HSV-*tk* gene (Fig. 5). The fact that both M/SAR elements functioned equally well, whereas the cMAR element is 3 kbp long and the sMAR is only 175 bp, also argued against a distance effect.

The chromatin insulator 5'HS4 can protect against promoter suppression. The insulator 5'HS4 element of the chicken β -globin LCR can protect transgenes against chromatin repression by preventing DNA methylation and histone deacetylation (45). We therefore tested whether this element can also protect against promoter suppression. To assay the effect of the 5'HS4 we used the human erythroleukemia K562 cell line in which the 5'HS4 was originally demonstrated to work as an insulator (11). Recent results suggest that 5'HS4 is unlikely to prevent silencing at all genomic integration sites (47). It was also shown that one copy of the 5'HS4 element insulates less efficiently than two linked copy (11).

Either pJF-2flip or pJF-2flipHS4, which is pJF-2flip with one copy of the 5'HS4 element interposed between the HSV-*tk* gene and the Pol 2 promoter (Fig.5), was stably transfected into K562 cells. Unlike *Ltk*- cells, K562 cells are not deficient in the endogenous *tk* gene. Thus they can grow in HAT containing medium. However, K562 cells that express the transfected HSV-*tk* gene become sensitive to GANC (GANC^S), whereas those not expressing the HSV-*tk* gene are resistant to this drug (GANC^R). We analysed 20 G418^R colonies with a single intact copy of pJF-2flip and 19 G418^R colonies with a single intact copy of pJF-2flipHS4. If the 5'HS4 element was to insulate the HSV-*tk* gene from the negative effect of the adjacent Pol2 promoter, one would expect a decrease in suppression of the HSV-*tk* gene as could be measured by a decrease in the number of G418^R GANC^R colonies. In the case of pJF-2flip, 17 out of 20 G418^R clones were also GANC^R, while in the case of the pJF-2flipHS4 only 7 out of 19 G418^R clones were also GANC^R. The remaining pJF-2flipHS4 colonies had a plating efficiency between 1% and 70% in the presence of GANC, indicating that part of the cells were expressing the HSV-*tk* gene.

The sMAR element behaved similarly to the insulator 5'HS4 element in K562 cells (data not shown).

DISCUSSION

Our results support earlier studies indicating that two adjacent transcription units can repress one another when they lie in tandem (20-29). Repression appears to be epigenetic, heritable and a reversible phenomenon (this study and reference 27).

Repression of a 3' unit by an adjacent 5' unit (transcriptional interference or promoter occlusion) has been attributed to read-through transcription (20-27). Consistent with this possibility, read-through transcription of polymerase I can render a downstream promoter inaccessible to transcription factors (48), and insertion of a transcription termination site between two adjacent units can protect against repression (21, 22, 25). Thus, transcription terminators, which are usually found upstream of promoters and/or between repeated genes, may play an important role in the regulation of gene expression (49-53).

However, repression of the 5' HSV-*tk* gene by the 3' Pol2 promoter (promoter suppression) cannot be ascribed to read-through transcription in single-copy clones. The mechanism of promoter suppression remains unclear (27-29), but appears to involve modification in chromatin structure and accessibility (Figs 3 and 4, and reference 29).

Interestingly, we found that the 5'HS4 insulator or M/SAR sequences can block promoter suppression when they were placed between the HSV-*tk* gene and the adjacent Pol2 promoter (Fig.5), suggesting that both chromatin insulators and M/SARs can block ``a cross-talk`` between two adjacent transcription units. This is consistent with their role as topological barriers that segregate transcription units into independent domains of activity. As transcription terminators, M/SARs and insulators could also play an important role in the regulation of gene expression as they have also been found upstream of promoters and between directly repeated genes (54-56).

Promoter suppression was blocked when M/SARs were placed between the HSV-*tk* gene and the Pol2 promoter, but not when M/SARs were placed on the outside of the HSV-*tk* gene and Pol2 promoter (Fig.5). This suggests that derepression of the HSV-*tk* gene was due to insulation against the negative effect of Pol2 promoter by M/SARs, and not due to transcription activation of the HSV-*tk* gene by M/SARs. Activation by M/SARs, which is thought to occur by spreading

open chromatin into adjacent regions (57, 58), should be able to occur whether M/SARs are flanking two linked units or interposed between them. Consistent with the possibility that some M/SARs also have the ability to act as insulators is that the cMAR element tested here can also block enhancers from activating promoters when it was interposed between the two entities (13, 30). Moreover, it has been shown that the *gypsy* insulator is associated with a M/SAR element (15), and that human M/SARs from the apolipoprotein and α -antitrypsin loci can behave as insulators in *Drosophila* (59).

Possible mechanisms of promoter suppression and insulation. Although the exact mechanism of promoter suppression is not known, two possibilities can be entertained. The first is competition between two linked promoters for transcription factors if these are limited. However, there are at least three arguments against this possibility. First, competition for transcription factors should occur irrespective of transcription orientation of the adjacent promoters, and would be influenced by the strength of each promoter and/or the distance between promoters. However, there is evidence that divergently oriented (head to head) promoters do not repress one another, rather they seem to enhance the activity of one another (60), and that promoter suppression is not dependent on the strength of promoters nor the distance between promoters (27-29). Second, competition should not be blocked by the insulator 5' HS4, as insulators are neutral and they do not interfere with promoter activity. Third, competition should be enhanced rather than blocked by the insulator 5'HS4, as transcription factors also bind to insulators.

The second possibility is DNA topology. The transcription process generates positive supercoils ahead of polymerases and negative supercoils behind a promoter (61). It was suggested that transcription-induced DNA topology (negative supercoiling) changes the nearby chromatin such that transcription complexes are not efficiently formed on an upstream promoter (29). Consistent with this possibility is the fact that DNA supercoiling is the only known signal that might be transmitted between two adjacent promoters and the finding that the upstream

promoter, which is repressed, is contained within inaccessible chromatin (Fig 3 and reference 29).

It is therefore tempting to suggest that the insulating effect of M/SARs and the 5'HS4 element we observed in this study is due to the control of DNA topology by these elements. There is evidence for a relationship between DNA topology, topological barriers and transcription (14, 16, 62). It was shown that negative supercoiling can induce stable base-unpairing of M/SARs and adjacent sequences, and that this unwinding capability seems to be important not only for their attachment to the nuclear matrix/scaffold, but also for the stabilisation of a transcriptionally active state of chromatin (16). Our finding that the core-unwinding element of M/SARs alone was sufficient to block suppression is also consistent with a topological model. Insulators may behave as M/SARs under superhelical stress. In transcriptionally active chromatin M/SARs and insulators are hypersensitive to topoisomerase II (14, 15, 57, 62) and some insulators can also form looped domains by attaching to nuclear structures (10). In addition, the core element of some insulators is GC-rich (7, 12) and it has been demonstrated that under negative supercoiling GC-rich sequences not only can assume non-B DNA conformations as M/SARs (63, 64) but can also block enhancers from activating promoters when interposed between them (65-67). Also consistent with a topological model is the evidence that some enhancers function only under superhelical stress (68) or only when they are linked to a functional RNA polymerase II promoter (69, 70).

The topological model is consistent with the tracking and steric models proposed for insulator function (reviewed in 2). The tracking model postulates that an activating signal must be transmitted through DNA in *cis* from the enhancer to the promoter, and that the insulator blocks this transmission, while the steric model postulates that the insulator partitions the enhancer and the promoter into two adjacent (looped) domains that act independent of one another. The topological model postulates that the signal (in this case superhelical stress) is transmitted from the promoter and that the insulator assumes a structural feature that would block this transmission. The structural feature may render the insulator highly sensitive to

topoisomerases, form nucleoprotein complexes or attach to the nuclear matrix/scaffold. However, our demonstration that some classes of insulators are capable of blocking promoter suppression is not consistent with, but does not rule out, the transcription decoy model (4). This model states that insulators have properties resembling promoters and block promoter/enhancer interactions by competing with the promoter for interactions with the enhancer element.

M/SAR and insulator elements may not block repression that was attributed to read-through transcription, as M/SARs were found within transcribed genes (refs in 59) and transcribing RNA polymerases were not blocked by insulators (9). Thus, the insulation effect of M/SARs and the 5'HS4 element that has not been observed in some studies may have been due to read-through transcription in multiple-copy integrated transgenes. M/SARs can protect only single-copy transgenes (71). Therefore, protection against chromosomal position effects may require flanking a transgene not only with M/SARs or chromatin insulators but also with transcription terminators. Such an approach may permit efficient and safe gene transfer experiments since chromosomal genes would also be protected against the repressive effect of transgenes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Pierre Chartrand for helpful advice and laboratory space to carry out a part of this project. We also like to thank Nadine Gusew, Marie-Josée Dicaire, Martine Mathieu, Ivan Brukner, and Nathalie Savard for superb technical assistance and Dr. Lee Wall for his critical reading of the manuscript. This work was supported by research grants from Bayer/Canadian Red Cross Society and the National Cancer Institute of Canada (Terry Fox Research Grant) to A.B. A.B. also wishes to acknowledge the salary support from Cancer Research Society/Medical Research Council of Canada scholarship program.

REFERENCES

1. Vazquez, J., Farkas, G., Gaszner, M., Udvardy, A., Muller, M., Hagstrom, K., Gyurkovics, H., Sipos, L., Gauz, J., Galloni, M., Hogga, I., Karch, F., and Schedl, P. (1993) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 45-53.
2. Bell, A.C., and Felsenfeld, G. (1999) *Curr. Opin. Genet. & Dev.* **9**, 191-198.
3. Udvardy, A. (1999) *EMBO J.* **18**, 1-8.
4. Geyer, P.K. (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 242-248
5. Gerasimova, T.I., and Corces, V.G. (1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 185-192.
6. Kellum, R., and Schedl, P. (1991) *Cell* **64**, 941-950.
7. Vazquez, J., and Schedl, P. (1994) *EMBO J.* **13**, 5984-5993.
8. Zhao, K., Hart, C.M., and Laemmli, U.K. (1995) *Cell* **81**, 879-889.
9. Geyer, P.K., and Corces, V.G. (1992) *Genes & Dev.* **6**, 1865-1873.
10. Gerasimova, T., Byrd, K., and Corces, V.G. (2000) *Mol. Cell.* **6**, 1025-1035.
11. Chung, J.H., Whiteley, M., and Felsenfeld, G. (1993) *Cell* **74**, 505-514.
12. Chung, J.H., Bell, A.C., and Felsenfeld, G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 575-580.
13. Bell, A.C., West, A.G. and Felsenfeld, G. (1999) *Cell* **98**, 387-396.
14. . Laemmli, U.K., Käs, E. Poljak, L., and Adachi, Y. (1992) *Curr. Opi. Genet. & Dev.* **2**, 275-285.
15. Nabirochkin, S., Ossokina, M., and Heidmann, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 2473-2479.
16. Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C. and Kohwi-Shigematsu, T. (1992) *Science* **255**, 195-197.
17. Wilson, C., Bellen, H.J., and Gehring, W.J. (1990) *Ann. Rev. Cell Biol.* **6**, 679-714.
18. Milot, E., Fraser, P., and Grosveld, F. (1996) *Trends Genet.* **12**, 123-126.
19. Cai, H., and Levine, M. (1995) *Nature* **376**, 533-536.
20. Adhya, S., and Gottesman, M. (1982) *Cell* **29**, 939-944.
21. Cullen, B.R., Lomedico, P.T. and Ju, G. (1984) *Nature* **307**, 241-245.
22. Proudfoot, N.J. (1986) *Nature* **322**, 562-565.

23. Corbin, V., and Maniatis, T. (1989) *Nature* **337**, 279-282.
24. Hirschman, J.E., Durbin, K.J. and Winston, F. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4608-4615.
25. Wu, J., Grindlay, G.J., Bushel, P., Mendelsohn, L., and Allan, M. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1209-1216.
26. Kadesch, T., and Berg, P. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2593-2601
27. Emerman, M., and Temin, H.M. (1984) *Cell* **39**, 459-467.
28. Emerman, M., and Temin, H.M. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 792-800.
29. Emerman, M., and Temin, H.M. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 9381-9396.
30. Stief, A., Winter, D.M. Stratling, W.H. and Sippel, A.E. (1989) *Nature* **341**, 343-345.
31. Phi-Van, L., von Kries, J.P. Ostertag, W., and Strätling, W.H. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2302-2307.
32. Colbere-Garapin, F., Chousterman, S. Horodniceanu, F. Kourilsky, P. and Garapin, A.-C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3755-3759.
33. Loeb, D.D., Padgett, P.W., Hardies, S.C., Shehee, W.D., Comer, M.B., Edgell, M.H., and Hutchison, C.A. III. (1986) *Mol Cell. Biol.* **6**, 168-182.
34. Belmaaza, A., Milot, E., Villemure, J.-F., and Chartrand, P. (1994) *EMBO J.* **13**, 5355-5360.
35. Ghattas, I.R., Sanes, J.R., and Major, J. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5848-5859.
36. Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R., and Bradley, A. (1991) *Cell* **64**, 693-702.
37. Sweet, R.W., Chao, M.V., and Axel, R. (1982) *Cell* **31**, 347-353.
38. Apperly, J.F., Luskey, B.D. and Williams, D.A. (1991) *Blood* **78**, 310-317.
39. Artlet, P., Grannemann, R., Stocking, C., Friel, J., Bartsch, J., and Hauser, H. (1991) *Gene* **99**, 249-254.
40. Garrick, D., Fiering, S., Martin, D.I.K., and Whitelaw, E. (1998) *Nat. Genet.* **18**, 56-59.
41. Mcknight, S.L., Gavis, E.R., Kingsbury, R., and Axel, R. (1981) *Cell* **25**, 385-398.
42. Hardies, S.C., Axelrod, D.E., Edgell, M.H., and Hutchison III, C.A. (1983) *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1163-1171.
43. Grunstein, M. (1997) *Nature* **389**, 349-352.

44. Yoshida, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1995) *BioEssays* **17**, 423-430.
45. Pikaart, M.J., Recillas-Targa, F., and Felsenfeld, G. (1998) *Genes & Dev.* **12**, 2852-2862.
46. Cockerill, P.N., Yuen, M.H., and Garrard, W.T. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 5394-5397.
47. Walters, M.C., Fiering, S., Bouhassira, E.E., Scalzo, D., Goeke, S., Magis, W., Garrick, D., Whitelaw, E., and Martin D.I.K. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3714-3726.
48. Bateman, E., and Paule, M.R. (1988) *Cell* **54**, 985-992.
49. Henderson, S., and Sollner-Webb, B. (1986) *Cell* **47**, 891-900.
50. Grummt, I., Kuhn, A., Bartsch, I., and Rosenbauer, H. (1986) *Cell* **47**, 901-911.
51. McStay, B., and Reeder, R.H. (1986) *Cell* **47**, 913-920.
52. Johnson, M.R., Norman, C., Reeve, M.A. Scully, J., Proudfoot, N.J. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 4008-4018.
53. Connelly, S., and Manley, J.L. (1989) *Cell* **57**, 561-571.
54. Mirkovitch, J., Mirault, M.-E., and Laemmli, U.K. (1984) *Cell* **39**, 223-232.
55. Robinet, C.C., O'connor, A., and Dunaway, M. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2866-2875.
56. Palla, F., Melfi, R., Anello, L., Di Bernardo, M., and Spinelli, G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2272-2277.
57. Käs, E., Poljak, L. Adachi, Y., and Laemmli, U.K. (1993) *EMBO J.* **12**, 115-126.
58. Jenuwein, T., Forrester, W.C. Fernandez-Herrero, L.A. Laible, G. Dull, M. and Grosschedl, R. (1997) *Nature* **385**, 269-272.
59. Namciu, S.J., Blochlinger, K.B. and Fournier, R.E.K. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2382-2391.
60. Dunaway, M., and Ostrander, E.A. (1993) *Nature* **361**, 746-748.
61. Liu, L.F., and Wang, J.C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7024-7027.
62. Udvardy, A., and Schedl, P. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7522-7530.
63. Dröge, P. (1994) *BioEssays* **16**, 91-99.
64. van Holde, K., and Zlatanova, J. (1994) *BioEssays* **16**, 59-68.
65. Raina, R., Cook, D. and Federoff, N. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 6355-6359.
66. Schreiber, E., and Schaffner, W. (1989) *Somatic cell & Mol. Genet.* **15**, 591-603.

67. Poljak, L., Seum, C. Mattioni, T. and Laemmli, U.K. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4386-4394.
68. Bagga, R., and Emerson, B.M. (1997) *Genes & Dev.* **11**, 629-639.
69. Reitman, M., Lee, E. Westphal, H. and Felsenfeld, G. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3990-3998.
70. McDowell, J.C., and Dean, A. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7600-7609.
71. Kalos, M., and Fournier, R.E.K. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 198-207.

Figure Legends

FIG. 1. Silencing of the HSV-*tk* gene by adjacent promoters. Arrows indicate transcriptional orientation of the HSV-*tk* gene promoter, the RNA polymerase II gene promoter (Pol2 pr) and the cytomegalovirus promoter (CMVpr). The filled box upstream of the promoterless *neo* gene (open box) represents the internal ribosomal entry site (IRES) of the EMC virus to allow internal initiation of *neo* translation when it is transcribed. The Pol2pr is placed 1,5 kbp from the HSV-*tk* gene in all plasmids and 1,4 kbp from the IRES-*neo* in pJF-2flip. Mouse *Ltk*- cells were transfected with each of the above constructs plus the pGKpuro as an internal control (see text). Seventy hours later, one third of transfected cells was plated in puromycin containing medium and two-third in HAT containing medium. HAT- and PURO-resistant colonies were counted 2 to 3 weeks after transfection. The relative number of HAT^R colonies for each construct is shown on the right. The average absolute number of HAT^R for pJF-1 from four experiments was 195 +/- 15.

FIG. 2. Expression of the HSV-*tk* gene in HAT-resistant and HAT-sensitive clones. Poly(A)+ RNA was isolated from these clones, electrophoretically separated and analysed by blot hybridization with a HSV-*tk* probe. A 1,300-nucleotide *tk* transcript was observed in the HAT-resistant colonies grown either in HAT-containing medium (lanes 2 and 3) or in medium without HAT (lanes 5 and 8). The *tk* transcript was almost absent from HAT-sensitive clones grown in G418 (lanes 1 and 4) or without G418 (lanes 6 and 7). The lower panels show re-hybridization of the membranes with a glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) probe to control for differences in the amount of RNA loaded.

FIG. 3. Analysis of chromatin structure at the HSV-*tk* gene promoter in expressing and non-expressing cell clones. Intact nuclei were isolated from cell clones and digested with EcoRI that cuts in the promoter of the HSV-*tk* gene. Genomic DNA was then isolated and digested with SmaI and XhoI. Internal HSV-*tk* sequences (PstI fragment) were used as a probe to detect the expected 1.4 kbp EcoRI-SmaI fragment. Nuclei from a G418-resistant cell clone that does not express the HSV-*tk* gene were resistant to EcoRI digestion (lane 1), whereas the nuclei derived

from a revertant cell clone that expresses the HSV-*tk* gene were cut efficiently either when this clone was maintained in HAT (lane 2) or in a nonselective medium (lane 3). In lane 4, genomic DNA from the parental clone that does not express the HSV-*tk* gene (lane 1) was isolated prior to digestion with EcoRI, SmaI and XhoI.

FIG. 4. The effect of histone deacetylase specific inhibitor TSA on the HSV-*tk* gene expression. One million cells from a G418-resistant but HAT-sensitive clone were grown in non-selective medium with various concentration of TSA for 24 hours, and subjected to HAT selection for 10 days. Reactivation of the silenced HSV-*tk* gene was scored as an increase in the number of HAT^R colonies.

FIG. 5. Protection of the HSV-*tk* gene against the adjacent promoter by MARs/SARs. The constructs shown on the left were stably co-transfected with pGKpuro, and HAT-resistant colonies were counted two weeks after transfection. The relative number of HAT-resistant colonies is shown on the right. The number of colonies from the control pJF-1 was arbitrarily set to 1.0. Experiments were done in parallel and in triplicate for all constructs.

Table 1. Ability of pJF-2flip derived HAT- and G418-resistant colonies to grow under selection of the second gene.

^aThe plating efficiency experiments were done as follows : 10^3 , 10^4 and 10^5 cells from HAT- and G418-resistant colonies were plated separately in G418 or HAT containing medium respectively. The medium was changed at three days interval. Nine days later cells were trypsinized and counted. The plating efficiency was considered as being equal to the number of cells grown in the first selection medium divided by the number of cells grown in the second selection medium.

HAT-resistant clones	plating efficiency ^a in G418	G418-resistant clones	plating efficiency in HAT
1	0.900	1	1.000
2	0.344	2	0.327
3	0.217	3	0.266
4	0.142	4	0.156
5	0.137	5	0.035
6	0.000	6	0.023
7-14	0.000	7-14	0.000

Figure 1

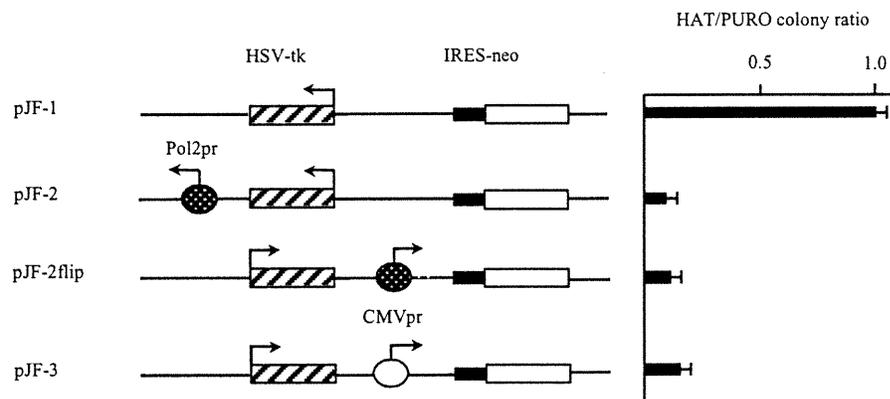


Figure 2

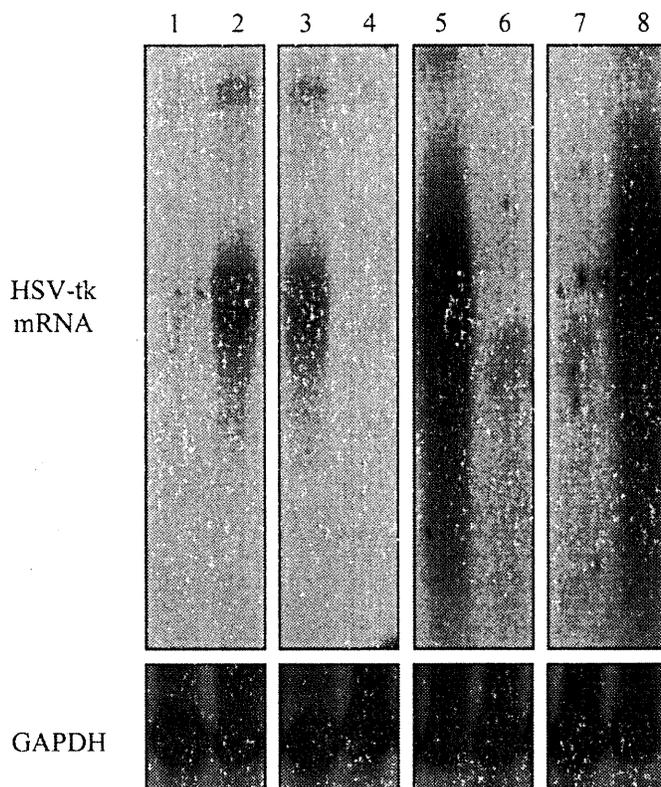


Figure 4

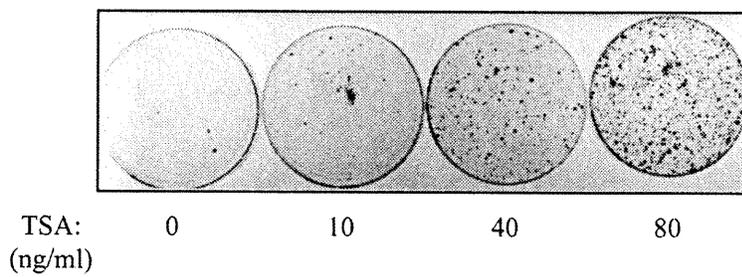


Figure 5

