

Université de Montréal

**Etude du rôle de la réponse UV sur le contrôle de la réparation par excision de nucléotides (NER) des dommages à l'ADN: Rôle des voies MAPK et de l'ADN polymérase eta**

par Raphaël Rouget

Programme de biologie moléculaire  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade  
de Ph.D en biologie moléculaire

Mai, 2013

© Rouget, 2013

## Résumé

La réponse cellulaire aux ultra-violets (UV), ou réponse UV, est une réponse complexe et spécialisée dans l'adaptation et la tolérance des dommages aux UV. Celle-ci est initiée par un grand nombre d'évènements moléculaires et de signalisation nucléaire mais aussi au niveau de la membrane plasmique ou du cytoplasme. L'importance et l'influence exactes de ces évènements sur la réparation par excision de nucléotides (NER) des dommages UV à l'ADN sont encore mal comprises et doivent encore être méthodiquement démontrées. Dans cette thèse, grâce à l'utilisation d'une méthode sensible d'analyse de la réparation NER basée sur la cytométrie en flux, il est montré, dans un premier temps, que l'activité des voies MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), qui sont des voies de signalisation de stress UV d'origine cytoplasmique, ne participent pas à l'efficacité de réparation NER des dommages UV dans les cellules humaines. En effet, l'abrogation de la signalisation MAPK, par inhibition pharmacologique, par utilisation de mutants dominant-négatifs ou par inhibition de leur expression endogène, ne révèlent aucun changement de la cinétique de réparation des dommages UV par excision de nucléotides. Cependant, l'utilisation de cette même méthode de réparation, mais cette fois, appliquée pour l'étude de réparation NER en fonction du cycle cellulaire, a permis de mettre en évidence la nécessité fonctionnelle de l'ADN polymérase translésionnelle  $\eta$  (Pol  $\eta$ ) dans la réparation NER des dommages UV, uniquement en phase S. Cette observation fut initialement caractérisée dans les cellules de patients affectés du syndrome variant de xérodémie pigmentaire (XP-V) puis, confirmée ensuite par l'inhibition de l'expression de Pol  $\eta$  endogène ou par la complémentation avec des mutants non-fonctionnels dans les cellules XP-V. Ces résultats indiquent que, contrairement à la réponse UV MAPK cytoplasmique, les évènements nucléaires comme la synthèse translésionnelle, peuvent influencer l'efficacité de réparation NER en phase S. Plus particulièrement, ces données établissent un lien possible entre la réparation NER en phase S et les niveaux de stress réplcatifs, révélé ici par la déficience fonctionnelle Pol  $\eta$  ou ATR. Les observations, présentées dans cette thèse, renforcent un rôle du point de contrôle S aux UV sur l'efficacité de la réparation NER et suggèrent que l'inhibition NER, observée en phase S dans les cellules XP-V, est modulée par le stress réplcatif. Un tel moyen de contrôle pourrait avoir une action plutôt protectrice pendant cette phase critique du cycle cellulaire.

**Mots clés:** UV, translésionnelle,  $\eta$ , MAPK, NER, CPD, cytométrie, phase-S, tolérance.

## **Abstract**

The UV-response is a complex cellular response to UV irradiation, which allows cellular adaptation and protection against deleterious effects of UV. This specialized response involves numerous molecular and signaling events from plasma membrane and from the nucleus represented, among others, by Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway activation and translesion synthesis respectively. More particularly, the exact role of these events on the removal UV-induced DNA damage by nucleotide excision repair (NER) in human cells is poorly understood and documented. By using a sensitive flow cytometry based-NER assay, presented and validated in this thesis, to quantify the removal of UV-DNA damage, it was unexpectedly found that Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signalling, originating from the the plasma membrane, does not regulate the efficiency of UV-induced DNA damage repair in human cells. Indeed, MAPK inhibition with pharmacological inhibitors, expression of short-hairpin RNA or dominant negative mutant, all together, substantiate fully the lack of effect of this signalling pathway on UV-damage removal by NER in human primaries and tumorous cells. Surprisingly, the same NER assay, applied to quantify the removal of UV-induced DNA damages as a function of the cell cycle, has shown a requirement of functional translesion synthesis polymerase eta (Pol  $\eta$ ) for efficient UV-DNA damage repair in human cells uniquely during S-phase, where its function is required for the bypass of UV DNA damage. This observation, originally made in fibroblasts from *xeroderma pigmentosum variant* syndrome (XP-V) afflicted patients, was further confirmed in normal human cells, by abrogation of endogenous Pol  $\eta$  expression or by complementation with Pol  $\eta$  in XP-V cells. All together, the data presented here, indicate that MAPK signaling play no role in NER-mediated UV-damage removal, but highlight a role for UV-DNA damage tolerance response, as translesion synthesis, in regulation of NER efficiency. More particularly, these observations establish a potential link between the S-Phase Repair (SPR) of UV-DNA damages and replicative stress, revealed by a deficiency of Pol  $\eta$  or ATR. This SPR defects seen under acute replicative stress conditions could impact tumorigenesis or chemotherapy outcomes. Moreover, SPR defects, seen in XP-V cells could be controlled by replicative stress, and also reflect a protective coordination to reduce high risks of genetic or chromosomal aberrations that may occur during DNA replication upon UV exposure.

**Key Words:** Translesion, UV, TLS, eta, MAPK, NER, S-phase, flow-cytometry, CPD.

## Tables des Matières

<b>Résumé</b> .....	ii
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>Tables des Matières</b> .....	iv
<b>Liste des Tableaux</b> .....	xi
<b>Liste des Figures et Schémas</b> .....	xii
<b>Remerciements</b> .....	xvi
<b>Liste des abréviations</b> .....	xviii
<b>INTRODUCTION</b> .....	2
<b>1 Les dommages à l'ADN</b> .....	2
1.1 Les dommages spontanés de l'ADN.....	3
1.2 Les dommages oxydatifs.....	3
1.3 L'alkylation des bases azotées.....	4
1.4 Les cassures monocaténares et bicaténares de l'ADN.....	6
1.4.1 Les cassures d'ADN monocaténares (SSB).....	7
1.4.2 Les cassures d'ADN bicaténares.....	8
1.5 Les mésappariements de bases de l'ADN et les pontages de l'ADN.....	10
1.6 Les dommages induits par les Ultra-Violets (UV).....	10
1.7 Formation des photo-produits dimériques de l'ADN induits par les UV.....	13
1.7.1 Formation des dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPD).....	14
1.7.2 Formation des dimères pyrimidiques (6-4) Pyrimidones (6-4PP).....	14
1.7.3 Formation des isomères de valence Dewar des 6-4PP (Dew-PP).....	15

1.8 Changements structuraux de la double hélice d'ADN induits par la présence de photodommages induits par les UV .....	16
1.9 Les dommages oxydatifs induits par les UV .....	18
1.10 Les cassures de l'ADN induites par les UV.....	18
1.11 Abondance des dommages à l'ADN induits par les différentes longueurs d'onde UV .....	19
<b>2. Les systèmes cellulaires de réparation des dommages à l'ADN.....</b>	<b>20</b>
2.1 La réparation par excision de bases (BER).....	22
2.2 La réparation par recombinaison homologue (HRR) et par jointure non-homologue (NHEJ)23	
2.3 La réparation des mésappariements et des pontages intercaténaux.....	24
<b>3. La réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER) des photodommages dimériques CPD et 6-4PP.....</b>	<b>25</b>
3.1 Les sous voies de réparation par excision de nucléotides : La réparation NER globale (GGNER) et la réparation NER couplée à la transcription (TCNER) .....	25
3.1.1 La voie de réparation NER globale (GGNER).....	27
3.1.2 La sous voie de réparation NER couplée à la transcription (TCNER) .....	28
3.2 Les Modèles d'assemblage des facteurs NER .....	29
3.3 Les syndromes et maladies associées à des défauts de réparation NER .....	30
3.3.1 Les syndromes de xérodémie pigmentaire (XP) .....	31
3.3.2 Le syndrome de Cockayne (CS).....	32
3.3.3 La maladie de trichothiodystrophie (TTD).....	33
3.4 Les étapes moléculaires du NER .....	34
3.4.1 La reconnaissance des dommages photodimériques CPD et 6-4PP .....	34
3.4.1.1 L'étape de reconnaissance du GGNER.....	34
3.4.1.2 L'étape de reconnaissance du dommage par le TCNER.....	37
3.4.2 Le recrutement des facteurs NER et formation du complexe de pré-incision .....	38
3.4.3 Etape de recrutement des endonucléases et incision de l'ADN endommagé .....	40
3.4.4 L'étape de resynthèse et de ligation (gap-filling).....	42
3.5 L'efficacité de réparation des photodommages CPD et 6-4PP .....	42

<b>4 <u>La réponse cellulaire aux ultra-violets : La réponse UV</u></b> .....	44
4.1 La réponse UV dépendante des dommages CPD et 6-4PP .....	47
4.2 La réponse UV extranucléaire indépendante des dommages à l'ADN .....	48
4.2.1 Les signaux d'origine membranaire .....	49
4.2.2 Activation de voies de signalisation cytoplasmiques .....	49
4.2.2.1 Activation des voies MAPK .....	49
4.2.2.2 Activation de la voie Akt/PI3K.....	49
4.2.2.3 Activation de la voie NFκB .....	50
4.2.3 Activation des programmes transcriptionnels de la réponse UV .....	51
<b>5. <u>Rôle de p53 dans la réponse UV et dans la régulation de la réparation par excision de nucléotides</u></b> ..	52
5.1 Régulation de la stabilité de p53 par Hdm2 .....	53
5.2 Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire induits par les UV .....	54
5.3 Rôle de p53 dans l'apoptose induite par les UV .....	54
5.4 Rôle de p53 dans la régulation de la réparation GGNER des CPD et des 6-4PP.....	55
5.5 Rôle des autres membres de la famille p53 dans la réponse UV : p63 et p73.....	57
<b>6 <u>Les voies de signalisation MAPK</u></b> .....	58
6.1 L'Organisation des voies MAPK : signalisation relais entre la membrane plasmique et le noyau.....	58
6.1.1 Une organisation modulaire à 3 niveaux .....	59
6.1.2 Les protéines d'échafaudage des voies MAPK .....	61
6.1.3 Le contrôle de l'activité des voies MAPK .....	63
6.2 La cascade ERK1/2.....	64
6.3 La cascade JNK1/2 .....	65
6.4 La cascade p38α/β/γ/δ.....	67
<b>7 <u>Activation et rôles des voies de signalisation MAPK dans la réponse aux UV</u></b> .....	69
7.1 Activation des cascades MAPK par les UV dans les cellules de mammifères .....	69
7.2 Rôles et fonctions apoptotiques des cascades MAPK activées par les UV.....	72
7.3 Régulation de la progression cellulaire .....	74

<b><u>I. A sensitive flow cytometry-based nucleotide excision repair assay unexpectedly reveals that mitogen-activated protein kinase signaling does not regulate the removal of UV-induced DNA damage in human cells</u></b> .....	79
<b><u>I.1 Les méthodes d'analyses quantitatives de la réparation des dommages à l'ADN par excision de nucléotides</u></b> .....	79
I.1.1 L'essai Comète (Comet Assay) .....	80
I.1.2 Le test UDS (Unscheduled DNA Synthesis) .....	81
I.1.3 la technique de LM-PCR (Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction).....	82
I.1.4 La méthode HCR (Host Cell Reactivation) .....	84
I.1.5 Immuno-détection des dommages induits par les UV. ....	85
I.1.5.1 La méthode RIA (Radio-Immunoprecipitation Assay) .....	86
I.1.5.2 L'essai d'Immuno-dot/slot blot (Dot/Slot Blot Assay) .....	86
I.1.5.3 La méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay) .....	87
<b><u>I.2 Hypothèses et Stratégie</u></b> .....	88
I.2.1 Hypothèses et objectifs.....	89
I.2.2 Stratégie expérimentale .....	90
I.2.3 Choix des lignées cellulaires humaines .....	90
I.2.4 Choix de la source UV .....	92
I.2.5 Choix des inhibiteurs pharmacologiques des voies MAPK.....	92
I.2.6 Choix de la méthode d'analyse de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides: Un essai de réparation NER basé sur la cytométrie en flux .....	94
<b><u>I.3 Matériels et Méthodes</u></b> .....	97
I.3.1 Types et culture cellulaires.....	97
I.3.2 Doses et exposition aux UV .....	97
I.3.3 Inhibition pharmacologique des voies MAPK dans les lignées cellulaires humaines .....	98
I.3.4 Inhibition de l'expression des voies ERK1/2 et JNK1/2 par expression transitoire d'ARNsh interférants (en épingle à cheveu) spécifiques .....	98

I.3.5 Inhibition stable de l'expression du suppresseur de tumeur p53 par expression d'un ARNsh interférant (en épingle à cheveu) .....	99
I.3.6 Inhibition de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$ par expression stable du mutant dominant-négatif p38 $\alpha$ (AGF) .....	99
I.3.7 Analyse de l'activation des voies MAPK par immuno-buvardage (Western Blotting) .....	100
I.3.8 Méthode d'analyse de la réparation NER basée sur la cytométrie en flux .....	101
I.3.9 Évaluation de la réponse apoptotique, de la survie clonogénique et de la prolifération cellulaire (test MTT) des cellules HDLF .....	103
<b>I.4 Résultats</b> .....	104
I.4.1 Activation et Inhibition des voies de signalisation MAPK induites par les UV, dans les lignées cellulaires humaines sélectionnées .....	104
I.4.2 Optimisation et validation de l'essai de réparation NER basé sur la cytométrie en flux .....	106
I.4.3 Effet de l'inactivation pharmacologique des voies MAPK sur la mort et la prolifération cellulaire dans la lignée cellulaire non-tumorale HDLF .....	114
<b>I.5 Discussion</b> .....	117
<b>II. Requirement for functional DNA polymerase eta in genome-wide repair of UV-induced DNA damage during S phase</b> .....	127
<b>II.1. Introduction</b> .....	127
II.1.1 Activation du point de contrôle S après une exposition aux UV .....	131
II.1.2 Mécanismes d'activation du point de contrôle en phase S induits par les UV .....	135
II.1.3 La tolérance des dommages et la synthèse translésionnelle de l'ADN .....	137
II.1.3.1 Le syndrome Variant de Xérodermie Pigmentaire (XP-V) .....	139
II.1.3.2 L'ADN polymérase eta (Pol $\eta$ ) et la synthèse translésionnelle induite par les UV .....	143
II.1.3.3 Les autres ADN polymérases de la synthèse translésionnelle .....	146
II.1.4 Mécanisme de franchissement des dommages induits par les UV : l'échange d'ADN polymérases (Polymerase switch) .....	148
II.1.4.1 PCNA, le clamp moléculaire clé du mécanisme de synthèse translésionnelle .....	149
II.1.4.2 Les modèles de franchissement des lésions à l'ADN .....	150

II.1.4.3 ATR et la réparation GGNER des dommages induits par les UV: une régulation dépendante du cycle cellulaire .....	154
<b>II.2 <u>Hypothèse et stratégie expérimentale</u></b> .....	155
II.2.1 Stratégie expérimentale .....	157
II.2.2 Choix des lignées cellulaires .....	158
<b>II.3 <u>Matériels et méthodes</u></b> .....	160
II.3.1 Types et Cultures cellulaires .....	160
II.3.2 Construction et expression des fusions EGFP-Pol $\eta$ dans les cellules XP30ROsv .....	160
II.3.3 Lysats cellulaires, immuno-précipitation de Pol $\eta$ et son immuno-détection par immuno-buvardage de type Western .....	162
II.3.4 Analyse de la localisation cellulaire des cellules XP30ROsv exprimant les différentes protéines fusionnées EGFP- Pol $\eta$ sauvage et mutantes.....	163
II.3.5 Imagerie des foyers (foci) Pol $\eta$ dans les cellules XP30ROsv en temps réel .....	163
II.3.6 Suppression de l'expression de Pol $\eta$ par utilisation d'ARN interférants, ARNsi .....	164
II.3.7 Traitement des cellules avec les inhibiteurs de la duplication de l'ADN.....	164
II.3.8 Survie cellulaire clonogénique .....	165
II.3.9 Analyse de la réparation GGNER en fonction du cycle cellulaire .....	165
<b>II.4 <u>Résultats</u></b> .....	166
II.4.1 Statut de la réparation NER des fibroblastes de patients XP-V en fonction du cycle cellulaire .....	166
II.4.2 Le défaut de réparation en phase S dans les cellules XP-V est attribuable à la perte de fonction Pol $\eta$ .....	170
II.4.3 La localisation nucléaire Pol $\eta$ , la formation de foyers et sa liaison à PCNA semblent nécessaires à une réparation SPR efficace dans les cellules humaines.....	174
II.4.4 L'abrogation de la réplication de l'ADN, avant une exposition aux UV, élimine le défaut de réparation SPR observé dans les fibroblastes XP-V et ATR-Seckel .....	177
II.4.5 Le défaut de réparation en phase S n'est plus observé par la réduction des niveaux de dommages induits par les UV .....	178
<b>II.5 <u>Discussion</u></b> .....	181

<b><u>CONCLUSION GENERALE ET PERSEPCTIVES</u></b> .....	193
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b> .....	201
<b><u>ANNEXES</u></b> .....	xxxi

## Liste des Tableaux

<b><u>Tableau 1:</u></b> Traits phénotypiques des syndromes d'un défaut de la réparation NER.....	33
<b><u>Tableau 2:</u></b> Les ADN polymérases humaines .....	139
<b><u>Tableau 3:</u></b> Listes de lignées fibroblastiques humaines XP-V, ATR déficientes et normales utilisées.....	159
<b><u>Tableau 4:</u></b> Liste des amorces PCR et de mutagenèse dirigée utilisées pour générer les fusions EGFP-Pol $\eta$ -Wt, EGFP-Pol $\eta$ - $\Delta$ Ct et EGFP-Pol $\eta$ -PIP1/2. ....	161

## Liste des Figures et Schémas

<b>Schéma 1:</b> Illustration de différents types et agents de dommages à l'ADN.....	6
<b>Schéma 2:</b> Origine des cassures bicaténaïres de l'ADN et leur conséquence biologique.....	9
<b>Schéma 3:</b> Spectre électromagnétique des rayonnements solaires. ....	12
<b>Schéma 4:</b> Formation des photoproduits dimériques CPD et 6-4PP à l'ADN induite par les UV. ....	15
<b>Schéma 5:</b> Les systèmes cellulaires de réparation des dommages à l'ADN.....	21
<b>Schéma 6:</b> Les sous voies et le mécanisme de la réparation par excision de nucléotides dans les cellules humaines. ....	27
<b>Schéma 7:</b> Représentation schématique et simplifiée de la réponse cellulaire après une exposition aux UV: La réponse UV.....	46
<b>Schéma 8:</b> Les voies MAPK, une organisation modulaire à trois niveaux.....	60
<b>Schéma 9:</b> Exemple d'analyse NER par <i>Ligation-Mediated-PCR</i> (LM-PCR) de la réparation des CPD sur le brin transcrit au locus c-jun en absence ou en présence de l'inhibiteur JNK1/2, le SP600125. ....	84
<b>Schéma 10:</b> Les inhibiteurs pharmacologiques des voies MAPK. ....	94
<b>Figure I.1:</b> Activation et inhibition pharmacologique de la signalisation MAPK induite par les UV dans des fibroblastes de peau primaires humains (HDSF).....	108
<b>Figure I.2:</b> Activation et inhibition pharmacologique des voies MAPK induites par les UV dans des fibroblastes primaires de poumons (HDLF) et cellules de carcinome de colon HCT116p53+/. ....	109
<b>Figure I.3:</b> Validation de l'essai de réparation GGNER basé sur la cytométrie en flux dans les cellules HDSF confluentes. ....	111
<b>Figure I.4:</b> Evaluation de la cinétique de réparation CPD et 6-4PP des cellules humaines primaires et tumorales sélectionnées en absence ou en présence d'un inhibiteur MAPK à l'aide de l'essai de réparation GGNER basé sur la cytométrie en flux.....	113

<b>Figure I.5:</b> Evaluation de la cinétique de réparation CPD des cellules humaines tumorales U2OS suite à l'inhibition de l'expression des voies MAPK, par utilisation d'ARN interférants contre les voies JNK1/2, ERK1/2 ou par utilisation du mutant dominant négatif p38 $\alpha$ (AGF) dans les cellules primaires HDLF, à l'aide de l'essai de réparation GGNER basé sur la cytométrie en flux. ....	115
<b>Figure I.6:</b> Modulation de la mort cellulaire et de la prolifération cellulaire par une inhibition pharmacologique de l'activité MAPK basale et induite par 10 J/m <sup>2</sup> UV dans les cellules humaines primaires HDLF. ....	118
<b>Schéma 11:</b> La Réponse UV d'origine nucléaire induite par les UV, dépendante des dommages à l'ADN. ....	131
<b>Schéma 12:</b> Représentation schématique de l'activation de la kinase ATR induite par la génération d'ADNss-RPA, provoquée par l'arrêt de la fourche de réplication au niveau du dommage. ....	140
<b>Schéma 13:</b> Les mécanismes cellulaires de tolérance des dommages induits par les UV en phase S au niveau de la fourche de réplication. ....	141
<b>Schéma 14:</b> Exemple de foyers nucléaires ( <i>nuclear foci</i> ) formés par EGFP-Pol $\eta$ -Wt dans les cellules XP-V (XP30ROsv) complétée et non exposées aux UV. ....	145
<b>Schéma 15:</b> Modèle simplifié de l'échange d'ADN polymérase (ou <i>Polymerase Switch</i> ) au niveau de la fourche de réplication arrêtée par un CPD. ....	153
<b>Schéma 16:</b> Exemple d'analyse de la réparation GGNER des 6-4PP en fonction du cycle cellulaire dans les cellules primaires XP30RO (XP-V) après une exposition UV de 15 J/m <sup>2</sup> , obtenue par la méthode d'analyse GGNER basée sur la cytométrie en flux. ....	158
<b>Figure II.1:</b> Réparation des 6-4 PP en fonction du cycle cellulaire dans les cellules primaires HDSF normales ou provenant de patients XP-V après une exposition à 15 J/m <sup>2</sup> UVC. ....	168
<b>Figure II.2:</b> La réparation GGNER en phase S des CPD est défaillante dans cellules primaires XP-V exposées à 15 J/m <sup>2</sup> UVC. ....	171
<b>Figure II.3:</b> La déficience de réparation GGNER des photo-dommages UV est attribuable à une perte fonctionnelle de l'ADN polymérase $\eta$ . ....	173
<b>Figure II.4:</b> Représentation schématique de la forme Pol $\eta$ -Wt et des mutants Pol $\eta$ - $\Delta$ Ct et Pol $\eta$ -PIP1/2 fusionnées à l'EGFP. ....	175
<b>Figure II.5:</b> Analyse des cellules XP30ROsv exprimant de façon stable les mutants fusionnés EGFP- Pol $\eta$ . ..	176

<b>Figure II.6:</b> Le défaut de réparation GGNER observé dans les cellules XP-V est abrogé par l'inhibition de la réplication de l'ADN avant une exposition UV de 15 J/m <sup>2</sup> UV.....	179
<b>Figure II.7:</b> La réparation GGNER en phase S est normale dans les cellules primaires XP-V et hTERT-immortalisées ATR-Seckel après une exposition à 5 J/m <sup>2</sup> UV.....	181
<b>Figure II.8:</b> Modèle simplifié et préliminaire du contrôle de réparation GGNER en phase S (SPR) dans les cellules humaines normales et dans les cellules SPR déficientes.....	190
<b>Figure II.9:</b> Modèle hypothétique du rôle protecteur de l'inhibition de l'activité GGNER dans les cellules XP-V ou Pol $\eta$ déficientes: Rôle potentiel du stress réplcatif et du point de contrôle S.....	191
<b>Figure II.10:</b> Approches pour évaluer l'impact et caractériser le(s) mécanisme(s) de contrôle SPR ATR/Pol $\eta$ dépendant(s).....	199
<b>Figure Supp.I.1:</b> Activation des voies MAPK et de la kinase MK2, induite par les UV dans les cellules GM01652B.....	xxxii
<b>Figure Supp.I.2:</b> Résultats bruts représentatifs de la cinétique de réparation GGNER des CPD dans les fibroblastes primaires humains normaux GM01652B, en absence ou en présence d'inhibiteur MAPK après une exposition à 10J/m <sup>2</sup> grâce à la méthode de réparation GGNER basée sur la cytométrie en flux.....	xxxiii
<b>Figure Supp.I.3:</b> Analyse de l'apoptose induite par les UV dans les cellules HDLF après un traitement aux inhibiteurs MAPK.....	xxxiv
<b>Figure Supp.I.4:</b> Les voies MAPK sont des régulateurs critiques de la progression cellulaire des cellules HDLF exposées ou non aux UV: effet des inhibiteurs pharmacologiques MAPK.....	xxxv
<b>Figure Supp.I.5:</b> Analyse de la progression cellulaire des cellules HDSF traitées au nocodazole en présence ou en absence des inhibiteurs pharmacologiques des voies MAPK après une exposition UV de 10 J/m <sup>2</sup> .....	xxxvi
<b>Figure Supp.II.1:</b> Etude de l'effet de la déficience Pol $\eta$ sur la réparation GGNER dans les cellules normales net XP-V.....	xxxvii
<b>ARTICLE 1</b> .....	xxxviii
<b>ARTICLE 2</b> .....	xlviii
<b>ARTICLE 3</b> .....	lix

***“En réalité, on sait seulement quand on sait peu. Avec le savoir augmente le doute.”***

*Johann Wolfgang von Goethe (1749 – 1832)*

*[Maximen und Reflexionen-1842]*

*A mes parents, Claude et Gérard...*

## **Remerciements**

Je tiens, en premier lieu, à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Elliot Drobetsky pour m'avoir confié ce projet de recherche, pour toute la confiance qu'il m'a accordé, sa direction et son sens de l'humour. Merci pour l'environnement de travail agréable qu'il a su créer. Merci Elliot pour m'avoir fait découvrir "the DNA Repair World".

Je tiens également à remercier le Dr. Yannick Auclair pour cette collaboration passionnante et enrichissante, pour nos discussions sociétales et sans qui ces travaux n'auraient pu être menés à bien.

Je remercie le Dr. el Bachir Affar pour ses conseils et aides techniques, ainsi que pour nos discussions scientifiques et tabagiques.

Je remercie également le Dr. Dindial Ramotar, pour nos discussions et son sens critique ainsi que les Drs. Santiago Costantino et Jonathan Belisle pour leur aide et assistance, et qui ont été indispensables pour l'imagerie cellulaire en temps réel.

Je remercie le Dr. Andréa LeBlanc, pour son aide précieuse dans mes démarches.

Je tiens aussi particulièrement à remercier, Viviane Jodoin, pour avoir su gérer la complexité de mon dossier au cours de toutes ces années et pour sa grande gentillesse.

Je remercie tout particulièrement mes parents pour leur soutien constant. Cette thèse est aussi la vôtre.

J'ai également une pensée pour Sylvana Lachance, Annie Beaudry et Yann Fortin pour leur gentillesse et leur aide technique.

Je remercie aussi le Dr. Leonard Levin et Rachel Beaubien pour m'avoir gracieusement prêté et aidé avec le microscope à fluorescence inverse.

Merci aussi à Nathalie Henley pour son aide qui a été précieuse avec le tri cellulaire, et d'avoir bichonné les cytomètres en flux, oh combien nécessaires.

Une pensée aussi pour Geneviève, Karine, Ian, Helen, Nazar, Nasser, Driss, et aussi tous ceux que j'ai pu omettre involontairement, et je m'en excuse par avance.

Je remercie bien évidemment les membres du jury pour avoir accepté de critiquer les recherches présentées dans cette thèse.

## Liste des abréviations

**µg/mL**: microgramme par milliLitre

**µL**: microLitre

**1BR**: hTERT-immortalized normal fibroblasts

**2N**: Normalité 2

**4EBP1**: Eukaryotic translation initiation factor 4E Binding Protein 1

**6-4PP** : 6-4 Photoproduit (*6-4 Photoproduct*)

**8oxoG**: 8-oxo-deoxyGuanine

**9.1.1**: Complexe Rad9-Rad1-Hus1

**adduit-N<sup>2</sup>-dG**: adduit nucleophile a la guanine à la position N2

**ADN** : Acide DeoxyriboNucleique.

**ADNc**: Acide DesoxyriboNucléique complémentaire

**ADNss** : ADN moncatenaire ou simple brin (*single strand DNA*)

**AhR**; Aromatic hydrocarbon Receptor

**Akt**: Ak thymoma (PKB)

**AP**: site abasique

**AP1**: Activator Protein 1

**Apaf-1**: Apoptotic protease activating factor 1

**APE1**: APoptosis Enhancer family member 1

**APIM**: AlkB homolog-2 PCNA Interacting Motif

**AraC**: β-D-arabinofuranosyl-cytosine

**ARN**: Acide RiboNucléique

**ARNm**: messagers Acide RiboNucleiques

**ARNsh**: Acide RiboNucléique interférant en épingle à cheveux (*small hairpin RNA*)

**ARNsi**: petit Acide RiboNucléique interférant (small interfering RNA, siRNA)

**aRPA**: alternative Replication Protein A

**ASK**: Apoptosis Signal-regulating Kinase

**AT**: Syndrome d'Ataxie Telangiectesique (*Ataxia Telangiectesia*)

**A-T**: Syndrome d'ataxie telangiectesique (*Ataxia-Telangiectasia*)

**ATF2**: Activating Transcription Factor 2

**ATM**: Ataxia-Telangiectasia Mutated kinase

**ATP**: Adénosine TriPhosphate

**ATR**: Ataxia- Telangiectasia and Rad3 related kinase

**ATRIP:** Ataxia- Telangiectasia and Rad3 related kinase Interacting Protein

**ATR-Seckel:** Syndrome d'ATR-Seckel

**Bax:** Bcl2-associated x protein

**BCC:** carcinomes des cellules basales

**Bcl-xL:** B-cell lymphoma-extra Large

**BER:** réparation par excision de base (*Base Excision Repair*)

**BLM:** Bloom syndrome protein

**BMK:** Big Mitogen-activated protein Kinase

**bp:** paire de bases (*base pair*)

**BPDE:** Benzo(a)Pyrene DiolEpoxyde

**BRCA1:** Breast cancer type 1 susceptibility protein 1

**BRCA2:** Breast cancer type 1 susceptibility protein 2

**BrdU:** Bromo-deoxy-Uridine

**BSA:** Bovine Serum Albumin

**CAK:** CDK-Activating Kinase

**CD:** Conserved Domain

**CD95/APO-1:** Apoptosis antigen 1

**CDC25:** Cell Division Cycle 25

**CDC25:** Cell Division Cycle 25 B protein

**CDC25A:** Cell Division Cycle 25A

**CDC25B:** Cell Division Cycle 25B

**CDC25C:** Cell Division Cycle 25C

**CDC42:** Cell Division Cycle 42 protein

**Cdk1:** Cyclin-dependant kinase 1

**Cdk2:** Cyclin-dependant kinase

**Cdk7:** Cyclin-dependant kinase 7

**CDKN2A:** Cyclin-dependant Kinase iNhibitor 2A

**CEN2:** Centrin-2

**Chk1:** Checkpoint kinase 1

**Chk2:** Checkpoint kinase 2

**CHOP:** C/EBP Homologous Protein

**c-jun:** jun proto-oncogene

**CK2:** Caseine Kinase II

**CoFS:** Syndrome squelettique Cérébro-Oculo-Facial (*Cerebral-oculo-Facial Syndrome*)  
**CoFS4:** Syndrome squelettique Cérébro-Oculo-Facial 4(*Cerebral-oculo-Facial Syndrome 4*)  
**CPD:** dimère cyclobutylique de pyrimidine (*Cyclobutane Pyrimidine Dimer*)  
**c-Raf:** Rapidly growing fibrosarcomas oncogene  
**c-rel:** reticuloendotheliosis oncogene  
**CS:** Syndrome de Cockayne  
**CS-A:** Cockayne Syndrome group A  
**CSA:** Cockayne Syndrome protein A  
**CS-B:** Cockayne syndrome group B  
**CSB:** Cockayne Syndrome protein B  
**CSK:** tampon cytosquelette (CytoSkeletal buffer)  
**Cul4A:** Cullin 4A  
**DAPI:** 2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6-carboxamide  
**DDB:** DNA damage binding  
**DDB1:** DNA damage binding protein 1  
**DDB2:** DNA damage binding protein 1  
**Dew-6-4PP:** isomère de valence de Dewar de 6-4 photoproduits  
**dFdC:** diFluoro-deoxyCytidine  
**DMEM:** Dulbecco's Minimum Essential Medium  
**DMSO:** DiMethyl-SulfOxyde  
**DSB:** cassure bicaténaire (*Double Strand Break*)  
**DUSP:** DUal Specificity Phosphatase  
**DVD:** Dual-Variable-Domain  
**E2F:** E2 transcription Factor 1  
**EBV:** virus d'Epstein-Barr  
**EDTA:** Acide Ethylène Diamine TétrAcétique (*Ethylene Diamine tetraacetic acid*)  
**EDTA:** Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid  
**EGF:** Epidermal Growth Factor  
**EGFP:** Enhanced Green Fluorescent Protein.  
**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor  
**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor  
**EGTA:** Acide Ethylene Glycol Tetra-Acétique (*Ethylene glycol tetraacetic acid*)  
**ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoAdsorbent Assay

**Elk1**: ETS-like protein 1  
**EMS**: Ethyl-Methyl-Sulfonate  
**ENU**: N-ethyl-Nitroso-Urée  
**ERCC1**: Excision Repair Cross-Complementing 1  
**ERK1/2**: Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2  
**ERK1**: Extracellular signal-Regulated Kinase 1  
**ERK2**: Extracellular signal-Regulated Kinase 2  
**ERK3/4**: Extracellular signal-Regulated Kinases 3 and 4  
**ERK3**: Extracellular signal-Regulated Kinase 3  
**ERK5 (BMK)**: Extracellular signal-Regulated Kinases 5  
**ERK6**: Extracellular signal-Regulated Kinases 6  
**ERK7/8**: Extracellular signal-Regulated Kinases 7 and 8  
**F02-98**: hTERT-immortalized ATR-Seckel fibroblasts  
**FA**: Syndrome d'anémie de Fanconi (Fanconi Anemia syndrome)  
**FANC**: Fanconi Anemia Complementing protein  
**FEN1**: Flap structure-specific EndoNuclease 1  
**FGFR** Fibroblast Growth Factor Receptor  
**FGFR**: Fibroblast Growth Factor Receptor  
**FITC**: Fluorescein IsoThioCyanate  
**Fos**: FBJ murine osteosarcoma oncogene  
**FosB**: FBJ murine osteosarcoma oncogene B  
**Fra1**: Fos-related antigen 1  
**Fra2**: Fos-related antigen 2  
**G1/S**: Phase G1 et phase S  
**G2/M**: Phase G2 et phase M  
**G418**: Geneticin®  
**GCK**: GluCoKinase  
**GC-MS**: Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry  
**GFP**: Green fluorescent protein  
**GGNER**: Système de Réparation par Excision de Nucleotides Globale et Genomique  
**GM01652B**: fibroblastes de peau humain primaire  
**GPCR**: G-Protein Coupled Receptor  
**GTPases**: Guanosine TriPhosphate hydrolase

**h:** heure  
**H2A:** Histone isoform 2A  
**H<sub>2</sub>O:** eau  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peroxyde d'hydrogène  
**H3:** Histone isoform 3  
**H4:** Histone isoform 4  
**HCl:** HydroChloric acid  
**HCR:** Host Cell Reactivation  
**HCT116:** Human Colon Tumor-derived 116 cells  
**HDLF(LL):** Human-Derived Lung Fibroblasts  
**HDLF:** Human Derived Lung Fibroblast  
**HDLF-E6:** Human Derived Lung Fibroblast expressing E6 oncoprotein.  
**Hdm2:** Human double minute protein 2  
**Hdmx:** Human double minute protein X  
**HDSF:** Human Derived Skin Fibroblast  
**HePTP:** Hematopoietic protein-tyrosine phosphatase  
**hMLH1:** human MutL Homolog 1  
**hMLH2:** human MutL Homolog 2  
**hMSH1:** human MutS Homolog 1  
**hMSH2:** human MutS Homolog 2  
**HNPCC:** Cancer colorectal non-polypeux herediaire (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*)  
**HPLC:** High Pressure Liquid Chromatography  
**HPLC-MS:** High-pressure Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry  
**HPV-E6:** Human PapillomaVirus E6 protein  
**HR23A:** RAD23 homolog A  
**HR23B:** RAD23 homolog B  
**HRR:** réparation par recombinaison homologue (*Homologous Recombinaison Repair*)  
**HSF-1:** Heat Shock Factor 1  
**hTERT:** immortalisée avec la telomerase humaine  
**HUS1:** Checkpoint protein homolog 1  
**ICL:** liaison covalente intercaténaire (*Interstrand CrossLink*)  
**IKK:** IκB Kinase  
**InR** Insulin Receptor

**InR:** Insulin Receptor  
**IR:** Radiations Ionisantes (*Ionizing Radiations*)  
**IκB:** Inhibitor of κB  
**J/m<sup>2</sup>/s:** Joule par mètre carré et par seconde  
**J/m<sup>2</sup>:** Joule par mètre carré  
**JIP1:** JNK-interacting protein 1  
**JLP:** JNK-associated leucine-zipper protein  
**JNK1/2 :** c-Jun N-terminal Kinases 1 et 2  
**JNK1/2/3:** c-Jun N-terminal Kinases 1,2 and 3  
**JNK1:** c-Jun N-terminal Kinases 1  
**JNK2:** c-Jun N-terminal Kinases 2  
**JNK3:** c-Jun N-terminal Kinases 3  
**junB:** jun proto-oncogene D  
**junD:** jun D proto-oncogene B  
**kcal/mol:** kilocalorie par mole  
**kDa:** KiloDalton  
**KSR:** Kinase Suppressor of Ras  
**LFS:** Li-Fraumeni syndrome  
**LM-PCR:** Ligation Mediated Polymerase Chain Reaction  
**Log (RFU):** Logarithme of Relative Fluorescence Unit  
**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MAPK1:** Mitogen-Activated Protein Kinase 1  
**MAPK11:** Mitogen-Activated Protein Kinase 11  
**MAPK12:** Mitogen-Activated Protein Kinase 12  
**MAPK13:** Mitogen-Activated Protein Kinase 13  
**MAPK14:** Mitogen-Activated Protein Kinase 14  
**MAPK3:** Mitogen-Activated Protein Kinase 3  
**MAPK8:** Mitogen-Activated Protein Kinase 8  
**MAPK9:** Mitogen-Activated Protein Kinase 9  
**MAPKAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase Activated-Protein Kinase  
**MAPKK:** Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase  
**MAPKKK:** Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase  
**MAT1:** Methionine AdenosylTransferase II, alpha

**MCM(2-7):** Mini-Chromosome Maintenance complex 2-7  
**MCM10:** Mini-Chromosome Maintenance complex 10  
**MDC1:** Mediator of DNA-damage Checkpoint 1  
**Mdm2:** Murine double minute protein 2  
**Me<sub>2</sub>SO:** voir DMSO  
**MEF:** Mouse Embryonic Fibroblast  
**MEF2:** Myocyte Enhancer Factor 2  
**MEK1/2:** MAPK/ERK Kinase 1 et 2  
**MEK1:** MAPK/ERK Kinase 1  
**MEK2:** MAPK/ERK Kinase 2  
**MEKK:** MAPK/ERK kinase kinase  
**MEKK3:** MAPK/ERK kinase kinase 3  
**MEKK4:** MAPK/ERK kinase kinase 4  
**MEKK6:** MAPK/ERK kinase kinase 6  
**MEME:** Eagle's Minimum Essential Medium  
**mg/ml:** milligramme par milliLitre  
**MgCl<sub>2</sub>:** Chlorure de magnesium (magnesium chloride)  
**MK:** voir MAPKAPK  
**MK2:** MAPKAPK 2 (voir MAPKAPK)  
**MK3:** MAPKAPK3 (voir MAPKAPK)  
**MK5:** MAPKAPK 5  
**MKK4:** MAPK/ERK kinase kinase 4  
**MKK7:** MAPK/ERK kinase kinase 7  
**MKP:** MAP Kinase Phosphatase  
**MKP-1:** MAP Kinase Phosphatase-1  
**MKP-3:** MAP Kinase Phosphatase-3  
**MKP7:** MAP Kinase Phosphatase 7  
**mL:** milliLitre  
**MLK:** Mixed lineage kinase  
**mM:** milliMolaire  
**MMR:** système de réparation des mésappariements (*MisMatch Repair*)  
**MNK** MAP kinase signal-iNtegrating Kinase  
**MRE11:** Meiotic REcombination 11 homolog

**MRN:** complexe MRE11-RAD50-NBS1

**MSK:** Mitogen and Stress activated protein kinase

**MTT:** 4,5-diM-ethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenylTetrazolium bromide

**Mus2:** DNA mismatch repair protein MSH2

**Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O:** Borate de Sodium

**Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>:** Orthovanadate de Sodium (*Sodium Orthovanadate*)

**NaCl:** Chlorure de sodium (sodium chloride)

**NBS:** Syndrome d'instabilité de Nijman (*Nijman Breakage Syndrome*)

**NBS1:** nibrin p95

**NER:** réparation par excision de nucléotides (*Nucleotide Excision Repair*)

**NFAT** Nuclear Factor of Activated T-cells

**NF-B:** NFκB responsive element

**NFκB:** Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

**ng/mL:** nanogramme par millilitre

**ng:** nanogramme

**NHEJ:** système de réparation par jointure non-homologue (*Non-Homologous End Joining*)

**O<sup>6</sup>MG:** O6-Methyl-Guanine

**ORC:** Origin Recognition Complex

**p19<sup>ARF</sup>:** Alternate Reading Frame of the ARF locus (CDKN2A)

**p21waf1:** Cyclin-dependent kinase inhibitor 1

**p300HAT:** Histone Acetyl Transferase, 300 kDa

**p38α/β/γ/δ:** Mitogen-activated protein kinases 38 kDa protein α, β, γ et δ

**p38α/β/γ:** Mitogen-activated protein kinases 38 kDa protein α, β et γ

**p38α/β:** Mitogen-activated protein kinases 38 kDa protein α et β

**p38α:** Mitogen-activated protein kinases 38 kDa protein α

**p38β:** Mitogen-activated protein kinases 38 kDa protein β

**p38γ:** Mitogen-activated protein kinases 38 kDa protein γ

**p70<sup>RSK</sup>:** ribosomal protein S6 kinase, 70kDa

**p90<sup>RSK</sup>:** ribosomal protein S6 kinase, 90kDa

**PAK:** P21-Activated Kinase

**PBS:** Phosphate Buffer Saline

**PBS-TB:** Phosphate Buffer Saline-Tween/BSA

**PCNA:** Proliferating cell nuclear antigen

**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**PCR:** Réaction de Polymérisation en Chaîne  
**PCR-Stop:** PCR-Stop assay  
**PDGFR:** Platelet Derived Growth Factor Receptor  
**PDGFR:** Platelet-Derived Growth Factor Receptor  
**PDK1:** Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1  
**PDK1:** Pyruvate Dehydrogenase Kinase, isoenzyme 1  
**PH:** Pleckstrin homology  
**pH:** potentiel Hydrogène  
**PI:** Propidium Iodide  
**PI3K:** Phosphatidylinositol 3-Kinase  
**PI3KK:** Phosphatidylinositol 3-Kinase Kinase  
**Pipes:** acide 1,4-Piperazinediethanesulfonique  
**PKB:** Protein Kinase B  
**PLK1/PLX1::** Polo-like kinase 1  
**Pol  $\mu$ :** ADN polymerase  $\mu$   
**Pol II:** ARN polymerase II  
**Pol  $\alpha$ :** ADN polymerase  $\alpha$   
**Pol  $\beta$ :** ADN polymerase  $\beta$   
**Pol  $\gamma$ :** ADN polymerase  $\gamma$   
**Pol  $\delta$ :** ADN polymerase  $\kappa$   
**Pol  $\epsilon$ :** ADN polymerase  $\epsilon$   
**Pol  $\zeta$ :** ADN polymerase  $\zeta$   
**Pol  $\eta$ :** ADN polymerase  $\eta$  eta  
**Pol  $\theta$ :** ADN polymerase  $\theta$   
**Pol  $\iota$ :** ADN polymerase  $\iota$   
**Pol  $\kappa$ :** ADN polymerase  $\kappa$   
**Pol  $\lambda$ :** ADN polymerase  $\lambda$   
**Pol  $\nu$ :** ADN polymerase  $\nu$   
**POSH:** Plenty Of SH3s protein  
**PP2A:** Protein phosphatase 2A  
**PP2C:** Protein phosphatase 2C  
**PTK:** Phosphatase of Tyrosine Kinase

**PTP-SL**: protein tyrosine phosphatase SL(receptor type, R)  
**Puma** : p53 up-regulated modulator of apoptosis  
**PVDF**: PolyVinylidene Fluoride  
**Rac**: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
**RAD1**: RecA homolog *E. coli* 50  
**Rad17**: RecA homolog *E. coli* 50  
**Rad5**: RecA homolog *E. coli* 50  
**RAD50**: RecA homolog *E. coli* 50  
**RAD51**: RecA homolog *E. coli* 51  
**Rad6**: RecA homolog *E. coli* 6  
**RAD9** RecA homolog *E. coli* 50  
**Ras**: Rat sarcoma GTPase protein  
**Rb**: Retinoblastoma protein  
**Rbx1**: Ring-box 1, E3 ubiquitin protein ligase  
**Ref-1**: Redox factor-1  
**RelA**: Reticuloendotheliosis protein A  
**RelB**: Reticuloendotheliosis protein B  
**REV1**: ADN polymerase REV 1  
**REV3**: sous-unite catalytique de l'ADN polymerase  $\zeta$   
**REV7**: sous-unite accessoire de l'ADN polymerase  $\zeta$   
**RFC**: Replication Factor C complex  
**RFC**: Replication Factor Complex  
**RFU**: Relative Fluorescence Unit  
**RIA**: Radio-Immunoprecipitation Assay  
**RKIP**: Raf Kinase Inhibitory Protein  
**RMN**: Résonance Magnétique Nucléaire  
**RNaseA**: Ribonuclease A  
**ROS**: especes reactives de l'oxygene  
**ROS**: Reactive Oxygen Species  
**RPA**: Replication Protein A  
**RPA**: Replication Protein A  
**RPA1**: Replication Protein A1, 70 kDa  
**RPA2**: Replication Protein A2, 32 kDa

**RPA3**: Replication Protein A3, 14 kDa  
**RSK**: Ribosomal protein S6 Kinase  
**RTK**: Receptor Tyrosin Kinase  
**RT-PCR**: Transcription Inverse suivie d'une amplification par réaction de Polymérisation en Chaîne  
**Rx**: Rayon ou Rayonnement x  
**R $\gamma$** : Rayon ou Rayonnement  $\gamma$   
**S**: Phase S  
**SAM**: S-AdenoylMethionine  
**SAPK**: Stress Activated protein Kinase  
**SAPK $\alpha$** : Stress-Activated Protein Kinase  $\alpha$   
**SAPK $\beta$** : Stress-Activated Protein Kinase  $\beta$   
**SAPK $\gamma$** : Stress-Activated Protein Kinase  $\gamma$   
**SCC**: carcinomes des cellules squameuses  
**SDS-PAGE**: Sodium-Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
**SH3**: prolin rich sequence for binding SH  
**Shc**: Sh2 domain protein c  
**SPR**: S-phase repair  
**Src**: Schmidt-ruppin A-2 homolog  
**SSA**: système de réparation par hybridation simple brin (*Single Strand Annealing*).  
**SSB**: cassure monocatenaire (*Single Strand break*)  
**SSL**: Lumière Solaire Simulée (*Simulated-SunLight*)  
**STAT1**: Signal Transducer and Activator of Transcription 1,  
**SV40**: Simian Virus 40  
**Syk**: Spleen tyrosine kinase (Syk)  
**TAK1**: TGF $\beta$  -activated kinase  
**TCNER**: Système de Réparation par Excision de Nucléotide Couplée à la Transcription  
**TD-PCR**: Terminal transferase-Polymerase Chain Reaction  
**TFIIH**: Transcription factor IIH  
**TG**: Thymine Glycol  
**Tim/Tipin**: Complexe Timeless and Tipin  
**TLS**: TransLesion Synthesis  
**TNRF1**: Tumor Necrosis Factor Recepter 1  
**TopBP1**: Topoisomerase (DNA) II Binding Protein 1

**TP53:** Tumor Protein 53

**TPA-RE:** O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate-Responsive Element

**TRAF:** TNF Receptor-Associated Factor

**TTD:** Syndrome de TrichoThioDystrophie (TrichoThioDystrophy syndrome)

**U2OS:** Osteosarcoma cells U2

**UBD:** Ubiquitin Binding domain

**UBD:** Ubiquitin Binding Domain

**UBZ:** Ubiquitin-Binding Zinc finger

**UDS:** Unscheduled DNA Synthesis

**USP1:** Ubiquitin-Specific Protease 1

**UV:** Ultra-Violets

**UVA:** Ultra-Violets A

**UVB:** Ultra-Violets B

**UVC:** Ultra-Violets C

**UVSS:** Syndrome de sensibilité aux UV (*UV Sensitivity Syndrome*)

**UVSSA :** UV-Sensitivity Syndrome protein A

**WRN:** Werner syndrome protein

**Wt:** form sauvage (*Wild type*)

**W/m<sup>2</sup>:** Watt par mètre carré (irradiance ou éclairement énergétique, puissance par unité de surface)

**XP:** Syndrome de Xerodermie Pigmentaire (Xeroderma Pigmentosum)

**XP115LO:** primary human XP-V fibroblasts, souche XP115LO

**XP30RO:** primary human XP-V fibroblasts, souche XP30RO

**XP30ROsv:** cellules de patients XP-V XP30RO transformées avec le SV40

**XP30ROsv-Polη/cl6:** SV40-transformed XP-V fibroblasts expressing stably Pol η Clone 6

**XP5MA:** primary human XP-V fibroblasts, souche XP5MA

**XP-A:** Syndrome de Xeroderma Pigmentosum complementing group A

**XPA:** Xeroderma Pigmentosum complementing A protein

**XP-B:** Syndrome de Xeroderma Pigmentosum complementing group B

**XPB:** Xeroderma Pigmentosum complementing B protein

**XP-C:** Syndrome de Xeroderma Pigmentosum complementing group C

**XPC:** Xeroderma Pigmentosum complementing C protein

**XP-D:** Syndrome de Xeroderma Pigmentosum complementing group D

**XPD:** Xeroderma Pigmentosum complementing D protein

**XP-E:** Syndrome de Xeroderma Pigmentosum complementing group E  
**XPE:** Xeroderma Pigmentosum complementing E protein  
**XP-F:** Syndrome de Xeroderma Pigmentosum complementing group F  
**XPF:** Xeroderma Pigmentosum complementing F protein  
**XP-G:** Syndrome de Xeroderma Pigmentosum complementing group G  
**XPG:** Xeroderma Pigmentosum complementing G protein  
**XPPHBE:** lymphocytes B (B-cells) de patients XP-V, transformés avec le virus EBV  
**XP-V:** Syndrome de Xeroderma Pigmentosum complementing group V ariant  
**XRCC3:** X-ray Repair Complementing defective repair in Chinese hamster cells 3  
**XRCC4:** X-ray Repair Complementing defective repair in Chinese hamster cells 4  
 **$\gamma$ H2AX:** Phosphorylated-Histone H2A.X  
 **$\mu$ M:** microMolaire

# **INTRODUCTION**

## **INTRODUCTION**

### **1 Les dommages à l'ADN**

La molécule d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) est formée de 3 types de composantes moléculaires: les bases azotées (l'adénine, la cytosine, la thymine et la guanine), le groupement ribose et le groupement phosphate. Ici le terme lésion ou dommage à l'ADN est un terme générique employé pour décrire toutes altérations de la structure chimique de l'ADN. Les dommages à l'ADN peuvent se produire dans ces 3 types de composantes moléculaires, qui, en raison de la multitude de cibles potentielles sur celles-ci, conduiront par leur réactivité, à la génération d'au moins  $10^4$  lésions à l'ADN d'une cellule de mammifère sur une journée de vie (Lindahl, 1993). En effet, la structure de l'ADN est constamment sujette à des altérations d'origines exogènes mais aussi endogènes. Ces « attaques » à l'ADN endogènes, souvent inhérentes à la réactivité chimique propre de l'ADN, proviennent fréquemment du métabolisme cellulaire et de l'instabilité biochimique des métabolites et composés endogènes. Ces altérations endogènes surviennent de façon non négligeable et ont des conséquences directes ou indirectes sur la vie cellulaire des mammifères. En revanche, les attaques d'origines exogènes produites par l'environnement cellulaire ou l'organisme, sont la principale source génératrice de lésions à l'ADN. Les sources exogènes de dommages présentent une grande hétérogénéité. Elles peuvent être aussi bien d'origine physique que d'origine chimique.

Globalement, il y a schématiquement, 4 grandes catégories de dommages à l'ADN. Il y a (i), les modifications covalentes de bases ; (ii), les cassures de l'ADN simple-brin ou double-brins ; (iii), les mésappariements de bases ; (iv), et les liaisons covalentes ou pontages intra- et inter-caténares.

## 1.1 Les dommages spontanés de l'ADN

Même si l'ADN est une molécule relativement stable, durant la respiration cellulaire normale mais aussi au cours d'autres réactions biochimiques, des espèces réactives de l'oxygène sont produites et l'endommagent, tels que les radicaux libre par exemple. Cependant, il arrive que des réactions spontanées d'hydrolyse de la molécule d'ADN se produisent et conduisent à des déaminations et/ou des éliminations complètes de bases azotées dénommées dépurinations ou dépyrimidinations (Gates, 2009). Par exemple les sites sans bases (désignés abasiques) peuvent être générés par hydrolyse spontanée de la liaison covalente reliant la base au squelette ribose-phosphate de l'ADN, la liaison N-glycosidique. En effet, la liaison N-glycosidique est une liaison très labile et instable qui par action de la chaleur ou d'agents alkylants conduit à son hydrolyse, puis à la création d'un site abasique ou AP. Ces derniers représentent les lésions spontanées les plus fréquentes alors que les bases déaminées sont beaucoup moins représentées. La déamination concerne principalement la cytosine ou la méthyl-cytosine. On compte toutefois quelques centaines de déamination de cytosine en uracile à l'échelle de la cellule (Lindahl, 1993). La déamination des purines est un événement spontané beaucoup plus rare.

## 1.2 Les dommages oxydatifs

Les dommages oxydatifs sont principalement causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et radicaux libres. Toutes les cellules aérobies, utilisant l'oxygène pour ses processus biochimiques essentiels à la vie cellulaire, sont exposées à de nombreux stress oxydatifs. Dans des conditions normales (sans stress d'origine exogène), le métabolisme cellulaire est une source majeure de ROS. Par exemple, les chaînes de transport des électrons peuvent générer des espèces superoxydes et toute une panoplie de ROS, qui peuvent réagir avec les lipides cellulaires, les protéines et bien entendu avec l'ADN. Dans la cellule, la source majeure du stress oxydatif endogène provient de la modification des bases azotées provoquée par ces ROS. Les protéines et lipides oxydés sont rapidement remplacés par dégradation et synthèse cellulaire *de novo*. En fait, plus d'une centaine de modifications oxydatives des bases

azotées ont été recensées (Dizdaroglu, 1991; Dizdaroglu, 2012). Les bases oxydées les plus connues et les plus représentées sont peut-être les 8-hydroxyguanines (8oxoG) et les glycols de thymine (TG) (**Schéma 1**).

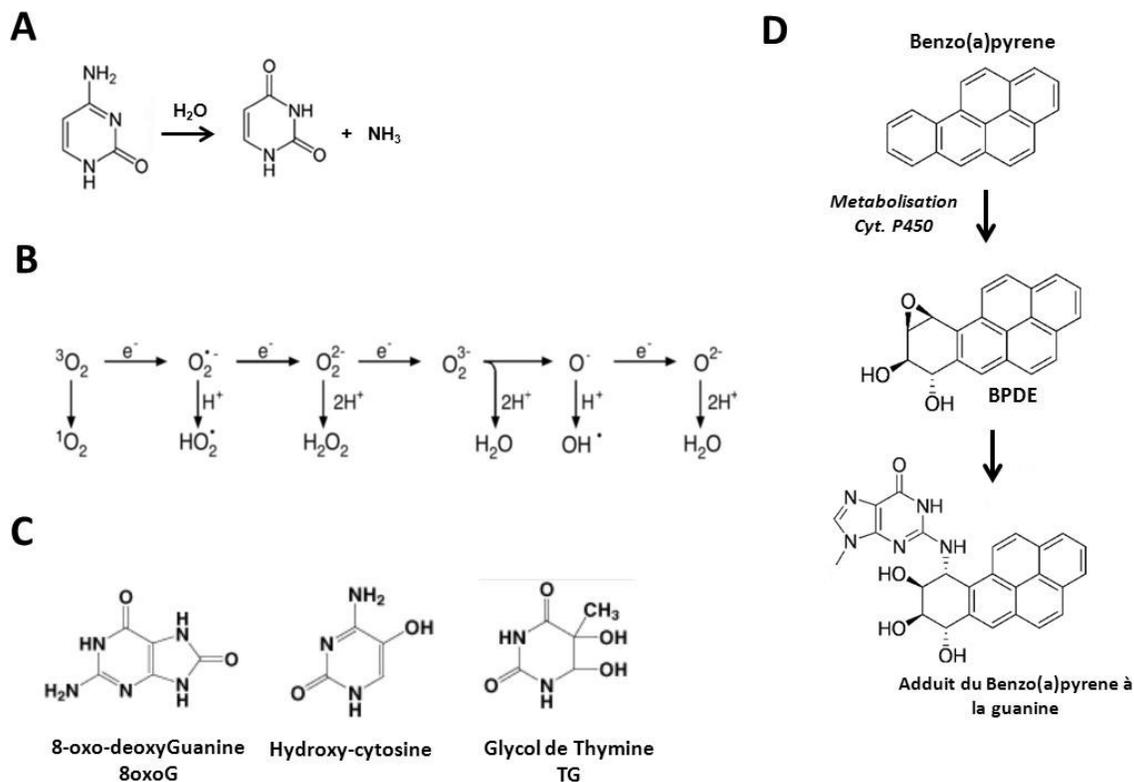
Les ROS peuvent être aussi d'origine exogène, et peuvent être générés aisément par les radiations ionisantes (comme les rayons X et les rayons  $\gamma$ ). En effet, la radio-hydrolyse des molécules d'eau produisent des radicaux hydroxyles hautement réactifs, qui réagissent avec les doubles liaisons des bases azotées (Yokoya et al., 2008). Nous verrons aussi que les UV sont également une source exogène de dommages à l'ADN oxydatifs. Les radiations UV peuvent générer des ROS par des mécanismes au cours desquels l'énergie UV est absorbée par des sensibilisateurs endogènes ou exogènes (chromophores), qui une fois excités moléculairement, peuvent conduire à la formation de ROS (Kvam and Tyrrell, 1997; Kvam and Tyrrell, 1999). La production de ROS par les UV concerne surtout les UVA et les UVB, en raison de leur énergie (Aroun et al., 2012; Hideg et al., 2013). Ces sensibilisateurs endogènes sont représentés entre autre par les dérivés de pyrimidine comme le pyridoxal-5'-phosphate pyridoxine et l'acide aminolevulinique (de Gruijl, 2000).

### 1.3 L'alkylation des bases azotées

En biologie, l'alkylation des bases azotées est génériquement employée pour désigner le transfert d'un groupement alkyl (méthyl, éthyle par exemple) sur les bases de l'ADN. La méthylation et l'éthylation sont les alkylations de bases les plus communes retrouvées sur l'ADN. L'alkylation réfère aussi souvent au transfert ou l'ajout de chaînes aliphatiques. Ces groupement de chaîne de carbone plus longue, sont transférés de façon covalente aux bases azotées et forment des adduits à l'ADN. L'alkylation peut se produire sur l'ensemble des composantes moléculaires de l'ADN comme le ribose ou sur les liaisons phosphodiester. Ces alkylations de l'ADN peuvent provenir de sources endogènes comme exogènes. Les sources endogènes sont essentiellement la S-adenosylmethionine (SAM) et les produits de peroxydations des lipides. En plus des ROS, un nombre important d'autres molécules peuvent causer des dommages à l'ADN, dont les agents alkylants, qui sont des composés chimiques capables de transférer des groupements alkyls sur l'ADN. Ces sources exogènes d'alkylations

sont diverses et comprennent un grand nombre d'agents toxiques environnementaux tels que le N-ethyl-Nitroso-Urée (ENU), l'Ethyl-Methyl-Sulfonate (EMS) et les composés aromatiques polycycliques (comme la dioxine, le 3-methylcholanthrene, le benzo(a)pyrene) et certains agents chimiothérapeutiques comme le malphalan ou la cisplatine. Ces derniers ont la particularité de former des pontages intracaténaux. Théoriquement, tous les sites nucléophiles de l'ADN sont des sites potentiels d'alkylations et peuvent donc supporter l'ajout d'adduits.

Les adduits de l'ADN (bulky DNA adducts): De nombreux produits chimiques peuvent alkyler l'ADN et ainsi former des adduits. Ces derniers résultent souvent d'une attaque de molécules électrophiles qui réagissent avec les centres nucléophiles des guanines en position N7, ou des adénines en position N3. Les composés polycycliques aromatiques par exemple vont devenir vraiment réactifs après activation métabolique par les cytochromes P450 hépatiques. Ces dernières vont souvent former, au cours de la métabolisation de ces composés, des groupements époxydes, hautement réactifs, qui pourront s'insérer dans l'ADN et réagir avec celui-ci. Par exemple, la cisplatine (di-amino-chloro-platinum), qui est un complexe métallique formé par coordination avec le platine, une fois activé par hydratation, va conduire à la génération de différents types de dommages comme des mono-adduits, des pontages intracaténaux et/ou intercaténaux. Cependant, il semble induire majoritairement des pontages intracaténaux N7-N7 (ICL) (Harrington et al., 2010). De plus certains métabolites comme le BPDE, résultant de la métabolisation de benzo(a)pyrene, réagiront plus facilement avec les purines (**Schéma 1**) pour former des adduits à l'ADN. En général, les adduits occupent stériquement un espace non négligeable qui conduit à une déformation importante de la double hélice d'ADN. Ces adduits «bulky» peuvent aussi générer des sites abasiques dans certains cas, simplement par hydrolyse de la base ayant l'adduit qui peut être parfois une structure chimiquement instable (Henkler et al., 2012). Ces derniers seront d'ailleurs la source de l'induction de mutations ponctuelles à l'ADN (Peterson, 2010).



**Schéma 1: Illustration de différents types et agents de dommages à l'ADN.**

**A.** Réaction de déamination lente endogène hydrolytique de la cytosine résultant en un uracile. **B.** les différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS) représentées entre autre par les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ), superoxydes ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) et les singlets oxygènes ( $^1\text{O}_2$ ). **C.** Exemples de bases azotées oxydées. **D.** Génération d'un adduit du benzo(a)pyrene à l'ADN par métabolisation du benzo(a)pyrene par les Cytochromes P450. Inspiré de (Takemura et al., 2010).

#### 1.4 Les cassures monocaténares et bicaténares de l'ADN

Les cassures à l'ADN ont une grande importance en biologie car celles-ci entraînent souvent un blocage de la transcription et de la réplication cellulaire, qui sont des processus moléculaires essentiels à la viabilité cellulaires des eucaryotes. De plus, ces cassures représentent la plus grande menace pour la stabilité génomique des cellules. Les cassures de l'ADN peuvent se produire sur un seul brin, formant des cassures monocaténares (ou SSB) ou sur les deux brins de la molécule d'ADN, formant des cassures double brin (DSB) ou

bicaténaire. Ces deux types de cassures résultent souvent de processus moléculaires endogènes comme la transcription, la réplication et la recombinaison homologe. Ils peuvent aussi être causés de façon exogène et proviennent surtout de l'exposition à des sources de dommages environnementales telles que les radiations ionisantes, les UV et les toxines environnementales.

#### 1.4.1 Les cassures d'ADN monocaténaire (SSB)

Les cassures de l'ADN monocaténaire ou SSB sont formées par cassure ou hydrolyse de la liaison ribose-phosphate sur un seul brin seulement. Ce type de cassure se produit souvent par la présence d'un dommage sur le groupement ribose ou sur les bases azotées. Cette hydrolyse est donc liée à l'instabilité intrinsèque de la molécule d'ADN et pourra se produire de façon directe ou indirecte. Les cassures monocaténaire de l'ADN générées de façon directe, sont principalement induites par les ROS ou les radiations ionisantes et se produisent souvent par désintégration de la structure du ribose, ou lorsque celui-ci le est endommagé, entre autre, par les ROS (Collins et al., 2005; Dedon, 2008; Ward, 1988). En revanche, les cassures monocaténaire générées, de façon indirecte, pourront se produire suite à une excision de la base endommagée par les systèmes de réparation de l'ADN, comme la réparation par excision de bases (BER), qui générera un site abasique instable et sera rapidement converti en SSB (Caldecott, 2008). De plus, l'oxydation des riboses en 5' par un radical alkyl, conduira aussi à la génération de SSB produits entre autre par l'action de certains antibiotiques ayant des propriétés anti-tumorales et radiomimétiques comme la bléomycine (Chen et al., 2008). Il y a également des cassures monocaténaire physiologiquement nécessaires, d'origines enzymatiques, comme les cassures SSB induites par les topoisomérases, qui contrôlent la torsion et le déroulement de la molécule d'ADN pour permettre la transcription, la réplication et la réparation. En général, les cassures monocaténaire de l'ADN sont plus fréquentes que les cassures bicaténaire et sont moins toxiques pour la cellule. Cependant, lorsqu'une cassure monocaténaire persiste trop longtemps, elle conduira invariablement à une cassure bicaténaire et plus particulièrement lors de la réplication (Caldecott, 2001; Ho and Satoh, 2003; Kuzminov, 2001; Vilenchik and Knudson, 2000). A

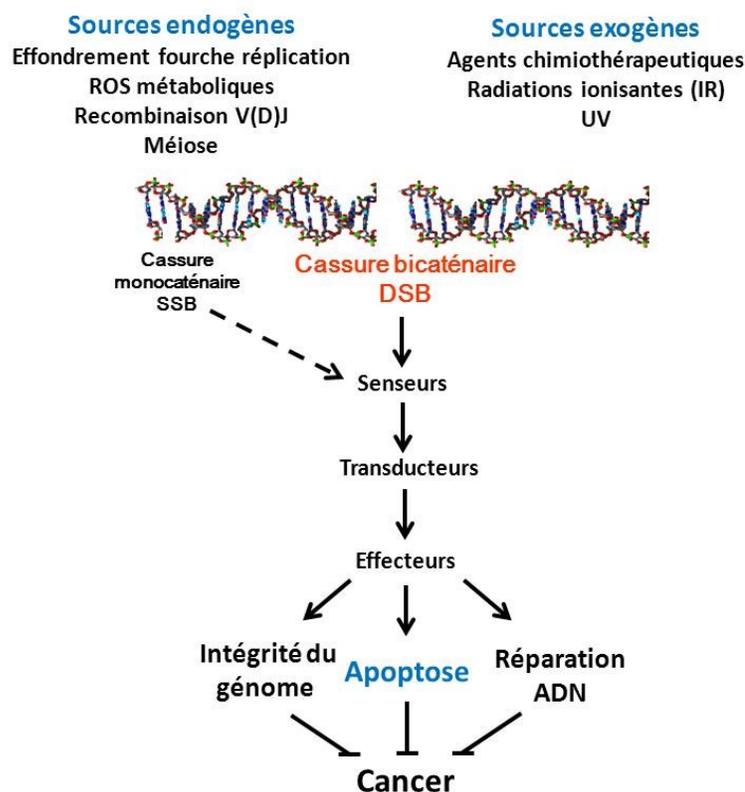
titre d'exemple, les cassures spontanées SSB endogènes de l'ADN ont été estimées de 10 à 50 SSB générées par minute et par cellule (Vilenchik and Knudson, 2000).

#### 1.4.2 Les cassures d'ADN bicaténares

Tel que précisé précédemment, les coupures d'ADN bicaténares, DSB, peuvent être générées de façon spontanées, notamment au cours du métabolisme cellulaire, mais sont aussi induites par des agents exogènes comme les radiations ionisantes, UV et les agents chimiques carcinogènes. Ces cassures DSB exogènes peuvent donc être générées par une multitude de mécanismes qui dépendront essentiellement du type de dommage induit sur l'ADN. Par contre, les DSB d'origine endogène peuvent être générées à partir de dommages oxydatifs émanant de processus moléculaires et cellulaires comme les chaînes respiratoires, mais peuvent aussi être produites par des processus essentiels à la fonction spécifique de certaines cellules spécialisées, comme la recombinaison des immunoglobulines (la recombinaison V(D)J) pour les lymphocytes B et aussi lors de la recombinaison méiotique (Hochwagen and Amon, 2006).

Les dommages induits par les radiations ionisantes : Les radiations ionisantes (IR), tels que les rayons X ou gamma, peuvent produire une grande variété de dommages à l'ADN par des mécanismes différents comme l'ionisation directe de l'ADN ou par excitation moléculaire. Autrement dit, les IR induiront directement des dommages par ionisation de l'ADN. De plus, l'action des IR peut produire des radicaux libres hautement réactifs (et ainsi modifier les bases), des DSB et aussi des pontages intra- et intercaténares de l'ADN. Les dommages oxydatifs induits par les IR seront principalement représentés par les 8oxoG, mais pas seulement, et n'auront pas les mêmes distributions que celles obtenues par les agents purement oxydatifs comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). D'ailleurs, il a été estimé que 2/3 des dommages induits par les radiations ionisantes sont produits par les radicaux libres et les ROS. Les lésions générées par ces derniers peuvent être converties en DSB par l'action des enzymes de réparation du BER ou par interaction avec les fourches de réplication (Sutherland et al., 2000).

Il semble que chaque chromosome puisse accumuler 5-10 coupures DSB en raison du stress oxydatif endogène (Costanzo et al., 2001) et qu'ils peuvent accumuler jusqu'à 50 DSB en phase S du cycle cellulaire par cellule et par génération (Vilenchik and Knudson, 2003). De plus, le nombre de coupures monocaténares ou bicaténares induites par les IR serait estimé à 35 DSB contre 1000 SSB par Gray pour une cellule en phase G1 (Ruiz de Almodovar et al., 1994). La létalité des radiations ionisantes réside essentiellement dans l'induction du nombre de coupures DSB alors que les coupures SSB sont moins toxiques que les DSB. Cette différence de toxicité reflète certainement la capacité des cellules à réparer rapidement ces SSB, ce qui minimisera leur conversion en DSB, qui sont des dommages hautement plus génotoxiques (Caldecott, 2001; Caldecott, 2008). D'ailleurs, une incapacité cellulaire à réparer les DSB sera létale ou entrainera des défauts génétiques et chromosomiques importants qui contribueront au développement du cancer (Kasperek and Humphrey, 2011; Khanna and Jackson, 2001; van Gent et al., 2001) (**Schéma 2**).



**Schéma 2:** Origine des cassures bicaténares de l'ADN et leur conséquence biologique.

### 1.5 Les mésappariements de bases de l'ADN et les pontages de l'ADN

Les mésappariements de bases ont des origines très diverses. L'ADN peut être soumis à des réarrangements spontanés transitoires du groupement cétone, aussi communément dénommé transition tautomériques des bases (Strazewski, 1988). La source principale des mésappariements est, bien entendue, la réplication de l'ADN dans laquelle les ADN polymérase sont susceptibles d'incorporer une mauvaise base par rapport au brin matriciel. Ces mésappariements reflètent surtout la fidélité de l'ADN polymérase (Lee et al., 2012a). Les mésappariements introduits pendant la réplication seront donc la principale source de mutations ponctuelles spontanées (Arnheim and Calabrese, 2009).

Les pontages inter-caténares (*interstrand crosslink, ICL*) représentent une catégorie importante des dommages à l'ADN, car ils peuvent empêcher la séparation, des brins d'ADN notamment lors de leur réplication (Vare et al., 2012). Les pontages inter- et intra-caténares peuvent aussi être induites par de nombreux agents de dommages endogènes et exogènes (Deans and West, 2011). Parmi ces agents endogènes, il y a les lipides peroxydés, comme les malonyl-dialdéhydes et parmi les agents exogènes, on retrouve, entre autre, un certain nombre d'agents chimiothérapeutiques comme la cisplatine.

### 1.6 Les dommages induits par les Ultra-Violets (UV)

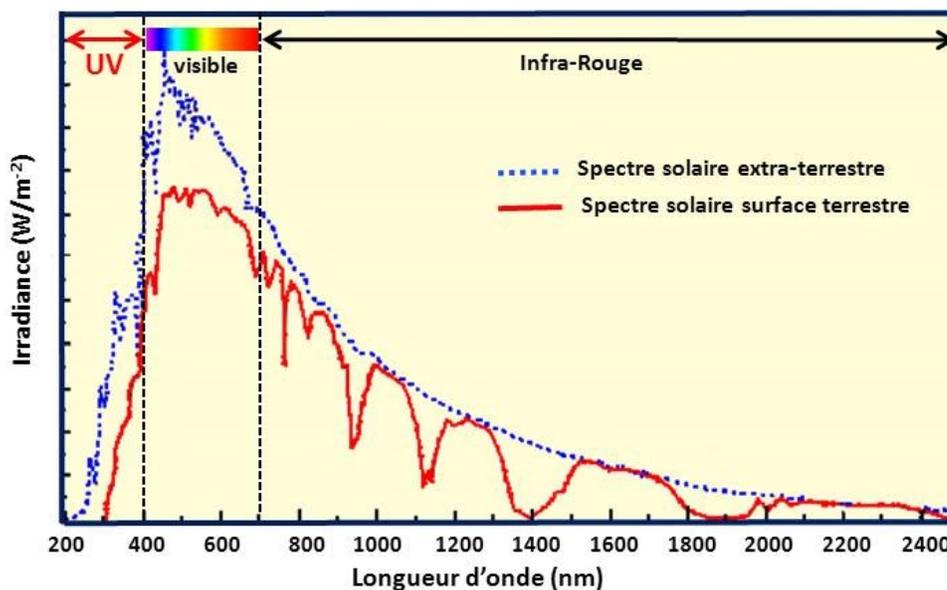
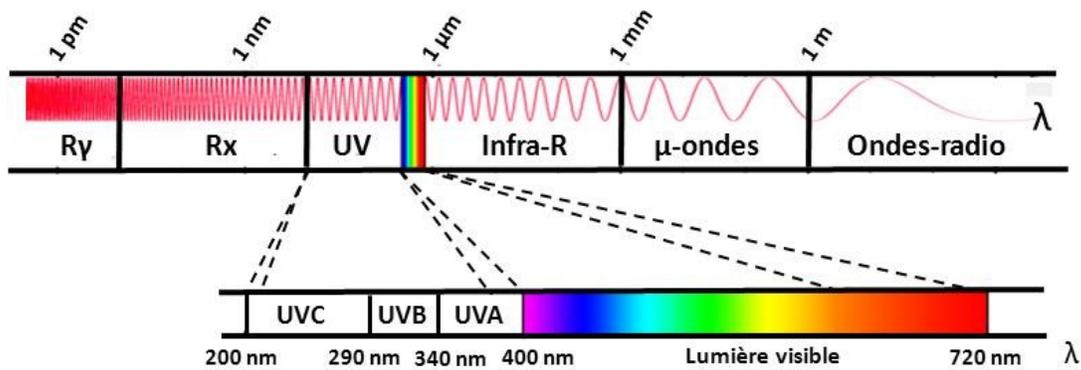
Les ultra-violets sont certainement la source de dommages exogènes, d'origine environnementale, à laquelle nous sommes naturellement et continuellement exposés, simplement en raison de leur origine solaire. Le soleil émet des énergies de longueur d'ondes différentes, de  $10^{-4}$  m à  $10^{-12}$  m, dont l'ensemble forme le spectre électromagnétique solaire, qui peut être divisé en deux grands groupes selon leur longueur d'onde. Il y a d'une part les radiations ionisantes (rayons X (Rx) et rayons gamma (R $\gamma$ )) et d'autre par les radiations non-ionisantes (radiations UV, visibles, et infrarouges). Fort heureusement, les radiations en dessous de 295 nm n'atteignent pas la surface de la terre (de Gruijl and van der Leun, 2000) (**Schéma 3**). En effet, les radiations de hautes énergies (comme les radiations ionisantes) sont

majoritairement déviées par la magnétosphère terrestre ou arrêtées par collisions atomiques dans les couches troposphériques et stratosphériques de l'atmosphère.

Par rapport au spectre électromagnétique solaire, le spectre magnétique de la lumière solaire terrestre est un spectre continu, divisé en trois catégories, (i) les ultra-violets (200-400 nm), la lumière visible (400-780 nm) et enfin les infrarouges. Les radiations UV peuvent être, elles-mêmes, divisées en trois catégories selon leur longueur d'onde, (i) les UVC (200-290 nm), les UVB (290-340 nm) et les UVA (340-400 nm) (**Schéma 3**). Plus exactement, les UV constituent 6% des radiations lumineuses émises à la surface terrestre, et sont représentés par les UVA et les UVB. En effet, les radiations UV en dessous de 290 nm n'atteignent pas la surface de la terre (de Gruijl and van der Leun, 2000), les UVC étant absorbés fortement par la couche d'ozone stratosphérique (voir graphique **Schéma 3**). Globalement, les radiations UV terrestres sont composées de 95 % UVA et 5 % UVB. De plus, étant donné que les radiations UV ont des longueurs d'ondes différentes et donc des niveaux d'énergie différents, la composition des dommages à l'ADN seront, eux aussi, différents. Dans les cellules, l'ADN est considéré comme l'un des chromophores principaux des radiations UV, à cause de sa longueur d'onde maximale d'absorption à 260 nm (Pattison and Davies, 2006).

*Mécanismes généraux d'induction des dommages à l'ADN par les UV* : Les UV peuvent induire des dommages à l'ADN via différents mécanismes moléculaires. Les mécanismes généraux de réaction des UV sur les molécules biologiques sont (i) les mécanismes directs de photoréaction, et ce en raison de leur action directe sur l'ADN et (ii), les mécanismes indirects de photo-sensibilisation, à cause de l'action indirecte de photo-sensibilisateurs endogènes et/ou exogènes sur la génération de dommages à l'ADN (Heil et al., 2011). Les mécanismes de photoréaction avec l'ADN s'effectuent par absorption directe de l'énergie photonique UV sur les bases azotées de l'ADN. Ces dernières, une fois excitées retrouveront leur stabilité électronique par réaction chimique. Les mécanismes indirects s'effectueront, en revanche, par des mécanismes de type I et de type II dans lesquels les photo-sensibilisateurs sont excités à leur état de triplet par les UV (Cadet et al., 2012). Les mécanismes de type I consistent en un transfert d'électrons d'un photo-sensibilisateur, préalablement excité par les UV, à d'autres molécules conduisant à la formation de radicaux libres. Tel que précisé avant, les mécanismes de type II se caractérisent par un transfert d'énergie du photo-sensibilisateur à la molécule de

dioxygène, qui conduira à la génération de ROS, principalement des singlets oxygène, mais aussi des anions superoxydes. Ces derniers, par réaction de dismutation, formeront du peroxyde d'hydrogène qui générera à son tour des radicaux libres hydroxyles, par réaction de fenton (voir **Schéma 1**) (Redmond and Gamlin, 1999). Toutes ces ROS représentent de puissants agents oxydants qui endommageront les molécules biologiques telles que les protéines et l'ADN.



**Schéma 3:** Spectre électromagnétique des rayonnements solaires.

(Infra-R), infra-rouges; (μ-ondes), micro-ondes; (UV), ultra-violets; (Rx), Rayons X; (Rγ), Rayons gamma ; (λ), longueur d'onde. Le graphique représente les énergies des radiations électromagnétiques solaires reçues à la surface terrestre au niveau de la mer après avoir traversées l'atmosphère (courbe rouge). Adapté de (Abbatt, 2003).

## 1.7 Formation des photo-produits dimériques de l'ADN induits par les UV

L'une des caractéristiques principales de l'action des UV sur l'ADN est la formation de photoproduits dimériques entre deux bases azotées adjacentes, sur le même brin d'ADN par absorption directe de l'énergie photonique (Cadet et al., 2012; Schreier et al., 2007). Cette photoréaction, s'effectue principalement entre les bases pyrimidiques adjacentes, les thymines, les cytosines et les 5-méthylcytosines (Beukers and Berends, 1960; Lemaire and Ruzsicska, 1993). En d'autres termes, les photoproduits induits par les UV se forment très rapidement et préférentiellement entre les séquences dipyrimidiques (Schreier et al., 2007). Néanmoins, les bases puriques peuvent aussi former des photoproduits de purines. Par exemple, deux adénines adjacentes peuvent former des photoproduits par dimérisation (Cadet et al., 2012; Ravanat et al., 2001). En règle générale, les photoproduits pyrimidiques obtenus par dimérisation se forment sur le même brin, mais il peut exister aussi des pyrimidines intercaténares obtenues par dimérisation des pyrimidines mais cette fois entre les 2 brins. Ces photoproduits particuliers intercaténares ne semblent exister que sur l'ADN de forme anhydre (ADN-A) (Beukers and Berends, 1960). Il est important de noter que l'occurrence des photoproduits puriques ou de photoproduits intercaténares est très minoritaire (Rastogi et al., 2010).

Les UV généreront essentiellement des photoproduits pyrimidiques qui seront majoritairement de trois types, (i), les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPD, *Cyclobutane Pyrimidine Dimer*), (ii) les photoproduits pyrimidiques 6-4 Pyrimidone (6-4PP, *6-4 pyrimidine Pyrimidone Photoproduct*) et enfin, (iii) les isomères de valence de Dewar des 6-4PP (Dew-PP). La formation relative de chacun de ces photoproduits pyrimidiques sur l'ADN dépendra de la longueur d'onde UV incidente, de la séquence de l'ADN ainsi que, plus généralement, du contexte réactionnel.

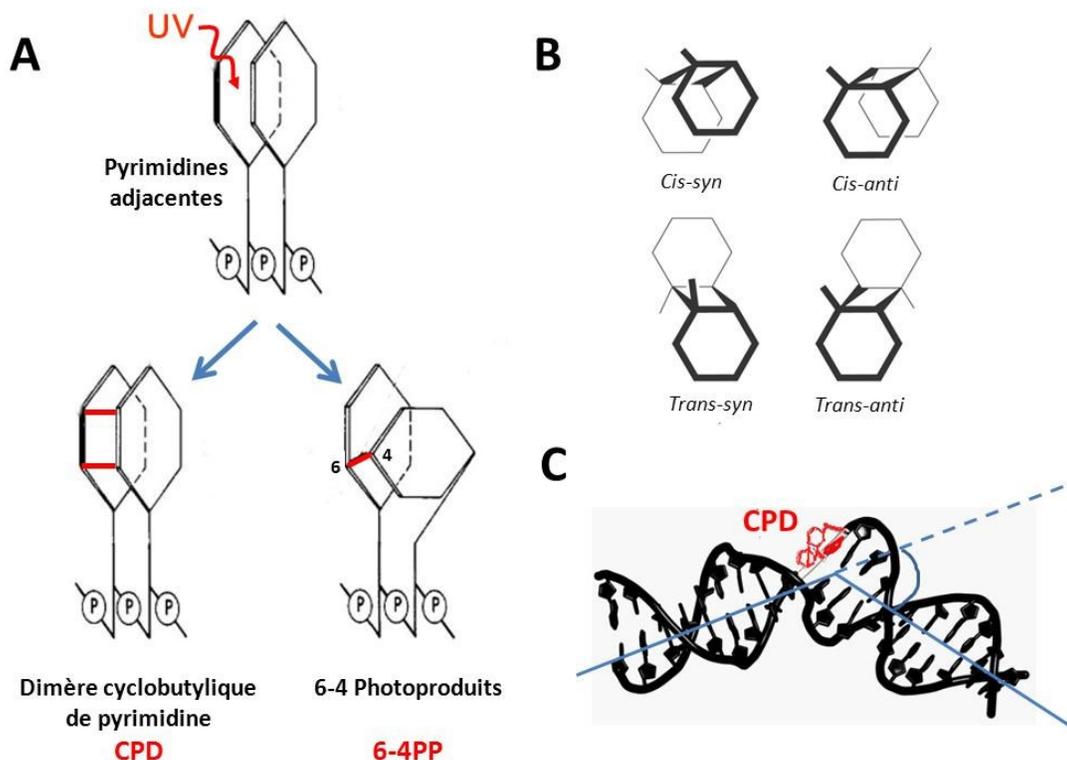
### 1.7.1 Formation des dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPD)

Les dimères cyclobutyliques de pyrimidines sont générés par un mécanisme de cyclo-addition double C5-C6 entre 2 bases pyrimidiques adjacentes. Plus précisément, suite à l'absorption photonique UV, la base se retrouve dans un état électronique excité instable. Ce gain d'énergie, ou cette instabilité, doit être dissipée afin de retrouver un état électronique plus stable (Durbeej and Eriksson, 2003). Cette dissipation d'énergie à partir de l'état de triplet s'effectue principalement par une réaction de cycloaddition avec la base pyrimidique qui lui est adjacente (Wang and Varghese, 1967 ; Yang et al., 2011). Cette réaction de cycloaddition [2+2] peut possiblement produire théoriquement 4 diastéréoisomères différents en fonction de l'orientation des deux cycles de pyrimidine par rapport au cycle cyclobutane, (**Schéma 4**), (Rastogi et al, 2010 ; Heil et al., 2011). Les diastéréoisomères, les plus fréquents, sont les stéréoisomères *cis-syn*. Il est intéressant de constater que l'on peut toutefois retrouver des isomères CPD *trans-syn* sur l'ADN simple brin, en raison de sa plus grande flexibilité. De plus, les CPD peuvent aussi faire l'objet de réversion, cependant, cette photoréversion nécessitera de plus hauts niveaux d'énergie photonique. De plus certains organismes, inférieurs aux mammifères, peuvent reverser enzymatiquement les CPD grâce aux photolyases (Sinha and Hader, 2002).

### 1.7.2 Formation des dimères pyrimidiques (6-4) Pyrimidones (6-4PP)

De la même façon que les CPD, les 6-4PP se produisent aussi par réaction de cycloaddition [2+2] mais avec toutefois quelques différences électrochimiques. En effet, de la même façon que les CPD, les 6-4PP sont formés grâce à la génération d'un état excité de triplet, mais sont aussi générés par la génération d'un état excité de singlet (Cadet et al., 2012; Zhang and Eriksson, 2006). Toutefois, la réaction de cyclo-addition se fera aussi à partir de la liaison double C5-C6 de la pyrimidine avec le C4 du groupement carbonyle ou imino de la pyrimidine adjacente en 3'. Les produits réactionnels ainsi formés par ce type de cycloaddition sont relativement instables et peuvent se réarranger spontanément pour former le 6-4PP, dans

lequel le groupement carbonyle ou imino est transféré au C5 de la pyrimidine en 5'. En d'autres termes, la cycloaddition TT forme l'oxétane par cycloaddition de la double liaison C5-C6 de la thymine en 5' et C4 de la thymine en 3', alors que la cycloaddition TC forme l'azetidine par cycloaddition de la double liaison C5-C6 de la thymine en 5' et C4 du groupement imino de la cytosine en 3' (Cadet et al., 2012; Rastogi et al., 2010).



**Schéma 4:** Formation des photoproduits dimériques CPD et 6-4PP à l'ADN induite par les UV.

**A.** Génération de photoproduits dimériques fréquents et génotoxiques induits par les UV. L'absorption de l'énergie photonique par 2 pyrimidines adjacentes conduit majoritairement à la formation de dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPD) et plus minoritairement aux 6-4 photoproduits (6-4PP). **B.** Les 4 conformères des CPD. *cis-syn*, indique le CPD en conformation *cis-syn*. *trans-syn*, indique le CPD en conformation *trans-syn*. **C.** Représentation schématique illustrant la déformation de la double hélice d'ADN induite par la présence d'un CPD. Adapté de (Rastogi et al., 2010).

### 1.7.3 Formation des isomères de valence Dewar des 6-4PP (Dew-PP)

Les 6-4PP ont la particularité d'être convertis en isomères de valence de Dewar, communément appelé, les photoproduits de Dewar (Haiser et al., 2012). Cette conversion des

6-4PP en Dew-PP se produit principalement suite à une exposition des 6-4PP aux UVB ou aux UVA (Taylor et al., 1990). Tout comme les CPD les Dew-PP sont modérément photoréactifs et peuvent être sujet à une réaction de réversion par les UVC en 6-4PP (Cadet et al., 2001; Haiser et al., 2012).

#### 1.7.4 Déamination des CPD et des 6-4PP

Les CPD et les 6-4PP contenant une cytosine peuvent faire l'objet de déamination hydrolytique. En effet, les CPD une fois formés peuvent être déaminés par hydrolyse de la liaison C4 du groupement amine pour générer un groupement carbonyle qui convertira une thymine en uracile (conversion TT à TU ou CC à CT) (Lee and Pfeifer, 2003; Peng and Shaw, 1996). D'ailleurs, l'une des mutations les plus communes, induites par les UV, sont les transitions C à T pour les CPD de cytosines, qui seraient fortement stimulées par la déamination hydrolytique de la cytosine du CPD (Lee and Pfeifer, 2003). La présence et la persistance des CPD de cytosines et thymines peuvent donc avoir des effets hautement génotoxique et délétère pour l'information génétique. De la même façon, les 6-4PP ainsi que leurs isomères de Dewar peuvent être convertis en uracile, bien que la déamination ne puisse se produire seulement sur la cytosine est en position 5' du dimer. De plus, il semble que la déamination des 6-4PP soit beaucoup plus lente que celle des CPD (Lemaire and Ruzsicska, 1993).

La formation des photoproduits dimériques des bases puriques ainsi que la formation des photoproduits monomériques de pyrimidine ne seront pas abordés ici, par simple soucis de concision.

#### 1.8 Changements structuraux de la double hélice d'ADN induits par la présence de photodommages induits par les UV

Il est connu que l'induction ou la présence des photodommages induits par les UV conduit à la création de mésappariements de bases par interaction non-canonique entre les bases des deux brins d'ADN. Ces interactions vont entraîner des contraintes structurales à la

double hélice d'ADN et entrainer une déformation qui sera plus ou moins importantes en fonction du dommage. Par exemple, les CPD, les 6-4PP ainsi que les 8oxoG induiront des déformations non négligeables et parfois marquées qui sont, à elles seules, importantes pour la reconnaissance du dommage par les systèmes de réparation de l'ADN.

Les CPD induisent des déformations locales de l'hélice d'ADN, causées par la dimérisation des pyrimidines adjacentes. Plus précisément, la longueur des liaisons covalentes entre les deux pyrimidines adjacente du CPD est plus courte que la distance entre les deux bases adjacentes non liées entre elles, ce qui résultera en une déformation locale de l'hélice d'ADN sous forme d'une inflexion de l'axe de la double hélice. Néanmoins, il faut souligner que le degré de la déformation de la double hélice d'ADN, induite par le CPD, n'est pas encore clairement établie et parfois contradictoire selon les études. La plupart des études théoriques et expérimentales, basées sur la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), rapportent une courbure induite variant de 6° à 28° par rapport à l'axe principal de rotation (Husain et al., 1988; Liu et al., 2000a). Mais il semble que la structure de la double hélice avec un CPD soit une structure flexible. Un CPD de conformation *cis-syn* induirait plutôt une courbure de 30° par rapport à l'axe de rotation accompagnée d'un déroulement de 9° (Park et al., 2002a). Quoiqu'il en soit, ces anomalies structurales induites par le CPD sur la double hélice viendraient affaiblir les liaisons hydrogènes Watson-Crick déjà établies en 5' de ce dernier et créeraient ainsi une augmentation de la flexibilité de la double hélice participant à la reconnaissance du dommage par les systèmes de réparation (**Schéma 4**).

Les 6-4PP, tout comme les CPD, induisent une déformation structurale de la double hélice, mais de manière plus marquée. En effet, les 6-4PP induisent une courbure plus importante de la double hélice (44°) que celle observée par les CPD (30°), avec notamment une incapacité de la base adjacente en 3' de former des liaisons hydrogènes (Kim and Choi, 1995; Mitchell and Nairn, 1989). Globalement, la présence d'un CPD résulte en une déstabilisation de 1,5 kcal/mol alors que les 6-4PP induisent une déstabilisation de -6 kcal/mol, reflétant l'importance de la déformation.

### 1.9 Les dommages oxydatifs induits par les UV

Comme déjà mentionné, les UV peuvent aussi induire indirectement des modifications des bases de l'ADN par des mécanismes oxydatifs de type I et de type II. Ces mécanismes concerneront principalement les UVA et plus minoritairement les UVB. En effet, la guanine et l'adénine, de fait de leur faible potentiel d'ionisation, sont le plus susceptibles à l'oxydation par des mécanismes de type I et de type II (Cadet et al., 2010). Les mécanismes de type I conduiront à la formation d'un radical cation de la guanine, qui par hydratation formera un radical instable qui sera, par la suite, oxydé par le dioxygène pour former le dommage 8oxoG (8-oxo-7-8-dihydroguanine), (**Schéma 1**), (Rosen et al., 1996). Dans les mécanismes de type II, la guanine réagira avec un singlet oxygène, provenant de la décomposition des endopéroxydes, induite par les UV, pour former des 8oxoG. L'oxydation des adénines et des thymines conduira à la formation de thymine glycol (TG) par des mécanismes de type I (Cadet et al., 2010). Cependant, contrairement aux bases puriques, les bases pyrimidiques restent beaucoup moins susceptibles à l'oxydation par les UV (Ravanat et al., 2004; Rosen et al., 1996).

### 1.10 Les cassures de l'ADN induites par les UV

Tout comme les IR, les UV peuvent aussi induire des cassures monocaténares (SSB) ou bicaténares (DSB) de l'ADN. Cependant ces cassures ne sont pas la conséquence directe de l'absorption des UV par l'ADN mais sont plutôt la conséquence indirecte de la formation de dommages oxydatifs et/ou des processus de réparation de l'ADN (Yajima et al., 2009). Tel que précisé, ces cassures sont souvent le résultat final de l'absorption de l'énergie photonique UV par les chromophores endogènes qui pourront générer des ROS comme les cofacteurs enzymatiques (Dunkern and Kaina, 2002; Ravanat et al., 2000). De plus les 8oxoG, générées par des mécanismes de type I ou II, engendreront des sites AP au cours de leur réparation qui pourront entraîner la formation de SSB. De plus, les lésions non réparés au moment de la réplication de l'ADN seront des inducteurs potentiels importants de cassures DSB (Dunkern and Kaina, 2002; Kuzminov, 2001). D'une manière plus générale, la fréquence des cassures

induites par les UV dépendra essentiellement de la longueur d'onde UV incidente ainsi que de la prolifération cellulaire (Yajima et al., 2009).

#### 1.11 Abondance des dommages à l'ADN induits par les différentes longueurs d'onde UV

Les dommages induits à l'ADN par les UV ne se produisent pas avec la même occurrence et la même fréquence et sont essentiellement dépendent de la longueur d'onde UV. Après une exposition aux UVB, les CPD (TT) représentent les dommages les plus abondants, suivis de CPD (CT), des 6-4PP et des Dew-PP et enfin les CPD (CC) (Cadet et al., 2005; Cadet et al., 2012). En effet, les 6-4PP sont moins abondants que les CPD, et montrent une occurrence de 3 à 10 fois inférieure à celle des CPD. Le ratio CPD/6-4PP ne semble pas être influencé par le contenu cellulaire, mais plutôt par la longueur d'onde UV (Cadet et al., 2001; Cadet et al., 2005; Douki and Cadet, 2001). Contrairement aux UVC et UVB, la lumière solaire simulée (SSL) génère des niveaux très faibles de 6-4PP (ratio CPD/6-4PP est de 20 à 40). Les spectres des dommages induits par l'exposition SSL ou UVB sont relativement similaires, mais non identiques en terme de nombres et de proportions. Les dommages oxydatifs 8oxoG, également retrouvés avec les UVB, sont beaucoup plus rares et restent minoritaires par rapport aux CPD. Les UVC et UVB sont principalement absorbés par l'ADN alors que les UVA, en raison de leur longueur d'onde plus élevée sont plus faiblement absorbés par l'ADN mais, en revanche, le sont beaucoup plus par les photosensibilisateurs endogènes. On pourrait s'attendre alors, qu'en raison de leur énergie, les dommages oxydatifs soient le type principal de dommages induits par les UVA. Étonnamment, il semble que les 8oxoG ne soient pas le type de lésions majoritairement produites mais que ce soit plutôt les CPD, avec toutefois une plus faible fréquence d'occurrence que les autres longueurs d'onde UV (Cadet et al., 2003; Douki et al., 1999; Douki et al., 2003; Jiang et al., 2009). D'ailleurs, les CPD induits par les UVA sont l'une des causes principales de la mutagenèse induite par les UVA (Drobetsky et al., 1995; Mouret et al., 2006).

Les cellules doivent faire face à une multitude de dommages à l'ADN endogènes et exogènes, et ont pour cela, développées un certain nombre de systèmes de réparation de leur

ADN afin de retirer les lésions présentes (ou induites) et ainsi éviter, au mieux, les conséquences désastreuses de leur présence sur l'intégrité de l'information génétique.

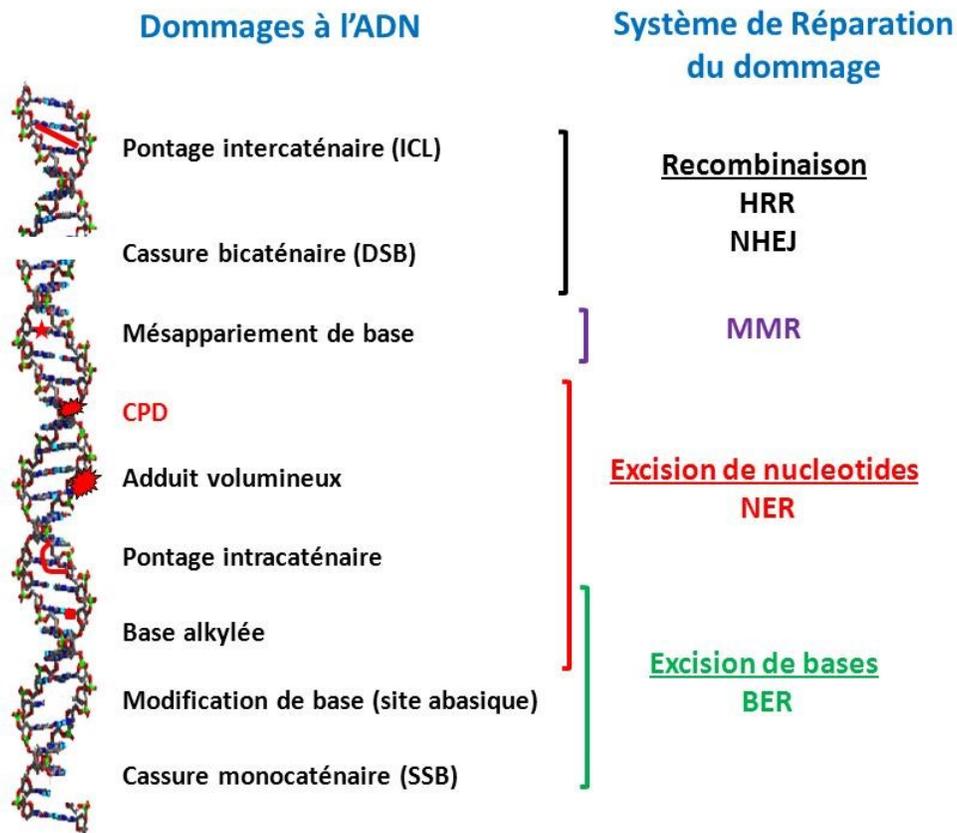
## **2. Les systèmes cellulaires de réparation des dommages à l'ADN**

Les dommages à l'ADN perturbent l'homéostasie cellulaire et par conséquent, être la cause de changements complexes et délétères s'ils venaient à persister trop longtemps sur le génome. Pour éviter ces scénarii catastrophes, les cellules eucaryotes et procaryotes ont acquises la capacité de tolérer et de réparer les dommages à l'ADN en développant des mécanismes ingénieux, leur permettant de lutter efficacement contre leur présence. En effet, il n'y pas un seul système de réparation pour réparer l'ensemble des dommages à l'ADN, car si celui-ci devenait défaillant, à l'échelle cellulaire ou de l'organisme, les conséquences seraient désastreuses et pourraient ainsi restreindre fortement les possibilités d'adaptation cellulaire aux stress environnementaux.

La réparation de l'ADN est un processus cellulaire ubiquitaire, composée d'un arsenal de mécanismes distincts et/ou concertés permettant de contrecarrer tous les effets potentiellement génotoxiques et mutagéniques de la présence de dommages. D'ailleurs, toutes altérations ou incapacités de ces mécanismes de réparation de l'ADN conduisent souvent à des maladies, ou syndromes sporadiques, ou héréditaires, rares et sont souvent associés aux syndromes de vieillissement. A présent, depuis le séquençage du génome humain, au moins 130 gènes furent identifiés et impliqués dans la réparation de l'ADN où ils exercent une fonction précise (Ronen and Glickman, 2001; Wood et al., 2005; Wood et al., 2001). Selon le type de lésions et en fonction de la phase du cycle cellulaire, un système de réparation spécifique est enclenché pour assurer l'élimination du dommage du génome. De plus, un même type de lésion peut être ciblé par différents systèmes de réparation. Dans les cellules de mammifères, on compte approximativement 7 systèmes de réparation principaux de l'ADN, faisant intervenir séquentiellement différents complexes protéiques ou facteurs de réparation (**Schéma 5**). Ces systèmes de réparation sont des parties intégrantes de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN et sont représentés par:

- (i) le système de réparation par excision de nucléotides (NER).
- (ii) le système de réparation par excision de bases (BER).
- (iii) le système de réparation des mésappariements (MMR).
- (iv) la réparation par recombinaison homologue (HRR).
- (v) le système de réparation par jointure non homologue (NHEJ).
- (vi) le système de réparation des pontages inter- et intracaténaux.
- (vii) le système de réparation par hybridation simple brin (SSA).

La réparation par excision de nucléotides est décrite en détails dans la section suivante, et ne sera donc pas abordée dans cette section.



**Schéma 5:** Les systèmes cellulaires principaux de réparation des dommages à l'ADN.

(HRR), Réparation par Recombinaison Homologue ; (NHEJ), réparation par Jointure Non Homologue ; (MMR), réparation des mésappariements ; (NER), Réparation par Excision de Nucléotides ; (BER), Réparation par Excision de Bases.

## 2.1 La réparation par excision de bases (BER)

La réparation par excision de bases élimine principalement les lésions faibles entre les bases, ainsi que les distorsions faibles de la molécule d'ADN, résultantes de modifications à l'ADN telles que l'addition de groupement alkyl, l'oxydation et la déamination de bases. Succinctement, le BER est initié par le clivage de la liaison N-glycosidique, ce qui entrainera le retrait de la base azotée, formant ainsi un site abasique ou AP. La formation de ces derniers est assurée par les ADN glycosylases. Plus précisément, la réparation des bases modifiées par le BER peut s'effectuer par deux mécanismes dépendants de l'activité lyase de l'ADN glycosylase impliquée. Le mécanisme de la lyase consiste simplement au retrait de la base par clivage de la liaison phospho-ester en 3' du site AP. Après la réaction lyase, le groupement phospho-rybosyl est ensuite retiré par l'action des AP endonucléases qui inciseront en 5' du site abasique (Robertson et al., 2009). En effet, si l'activité lyase de l'ADN glycosylase est présente, l'incision 5' du ribose est effectuée par APE1 (ref1) puis la base est ensuite retirée par activité phosphodiesterase de l'ADN polymérase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ). Ce remplacement du dommage par un nucléotide est la réparation dite de patch court (*short patch*). Alternativement, les ADN glycosylases qui n'ont pas d'activité lyase intrinsèque, la coupure en 5', également assurée par APE1, entrainera un déplacement du brin en 3' de la coupure de 2 à 10 nucléotides, suivie ensuite par une excision assurée par l'endonucléase FEN1. Cette lacune de 10 nucléotides sera comblée et reliquée également par Pol  $\beta$ . Ce dernier mode de réparation BER est souvent désigné comme patch long (*long patch*) (Robertson et al., 2009). La voie BER est la plus couramment utilisée et semble être majoritairement une réparation BER de type *short patch* (Dianov et al., 2003; Memisoglu and Samson, 2000).

Les ADN glycosylases peuvent reconnaître spécifiquement les bases méthylées, les bases oxydées et les bases déaminées. Ces enzymes doivent établir des interactions spécifiques avec le brin complémentaire, qui sont accompagnées d'une reconnaissance efficace des bases altérées ou modifiées. Une des stratégies de reconnaissance des glycosylases serait de diffuser le long du sillon mineur de l'ADN jusqu'à que celle-ci rencontre une lésion spécifique à réparer. Il y a 11 DNA glycosylases, chacune pouvant

reconnaitre un spectre de lésion relativement restreint, avec certains chevauchements (Krokan and Bjoras, 2013).

Il n'y a pas de maladies génétiques héréditaires connues comme étant causées directement par un défaut de réparation BER. Cependant, des altérations ou des variations de l'activité BER peuvent être associées à divers pathologies comme le cancer colorectal par exemple (Al-Tassan et al., 2002). Le système BER est un système protecteur important et incontournable. D'autres associations pourront certainement voir le jour avec d'autres cancers (Krokan and Bjoras, 2013).

## 2.2 La réparation par recombinaison homologue (HRR) et par jointure non-homologue (NHEJ)

La réparation de l'ADN par recombinaison homologue (HRR) est principalement utilisée pour réparer les cassures bicaténaire de la double hélice d'ADN. Plus exactement, les DSB peuvent être réparés par deux systèmes de réparation différents, la recombinaison homologue ou la réparation par jointure non-homologue (NHEJ). Plus particulièrement, le système HRR utilise un ADN matrice homologue et fait partie des systèmes de réparation fidèles (*error-free*). Ce processus de réparation comprends 3 étapes : (i) l'invasion du brin à réparer suivie de, (ii) la migration de la « bulle » de réparation ou migration des branches, puis (iii) la formation et la résolution des jonctions de Holliday, connues aussi sous le nom de jonction de recombinaison homologue (Hartlerode and Scully, 2009; Jackson, 2002; Khanna and Jackson, 2001). Chez les eucaryotes, l'invasion des brins et la migration des branches sont déclenchées par RAD51. Cependant, le complexe MRN (MRE11-RAD51-NBS1) pourrait être aussi nécessaire pour préparer les extrémités d'ADN avant l'invasion par l'ADN simple brin. L'activation de RAD51 débutera ainsi le processus de réparation par recombinaison homologue. La résolution des jonctions de Holliday s'effectuera à l'aide d'endonucléases spécifiques, les résolvases qui ont été identifiées seulement en 2008 (Ip et al., 2008; Jackson, 2002; Rass et al., 2010).

La réparation alternative au HRR, la recombinaison par jointure non-homologue (NHEJ) s'accompagne souvent d'une perte d'un ou plusieurs nucléotides, contrairement au HRR. Dans ce système, l'hétérodimère Ku70-Ku80 va se lier aux extrémités de la cassure

DSB et permettre le recrutement de DNA-PK. La ligation des extrémités sera effectuée par le complexe de réparation XRCC4-ligaseIV (Khanna and Jackson, 2001; Mahaney et al., 2009). Le complexe MRN peut également participer au NHEJ, et plus particulièrement pendant la recombinaison V(D)J des immunoglobulines. Contrairement au HRR, la réparation NHEJ ne nécessite pas d'ADN matrice non-endommagé, les extrémités d'ADN sont simplement liguées entre elles.

La contribution relative de ces deux voies de réparation des DSB dépendra essentiellement de la phase du cycle cellulaire où la cellule est engagée au moment de réparer ses DSB (Kass et al., 2013; Yun and Hiom, 2009). Par exemple, le NHEJ semble plus actif en G1 alors que le HRR est le système majoritaire de réparation des DSB en phase S et en phase G2 (Escribano-Diaz et al., 2013). Mais évidemment, ces contributions pourront parfois varier selon le type cellulaire et le contexte moléculaire. Il est important de noter que la conversion génique se produira lorsque les deux duplex d'ADN ne sont pas exactement homologues. Le système HRR est, enfin de compte, le système de réparation principal pour résoudre les DSB induits par effondrement des fourches de réplication, alors que le NHEJ est absolument nécessaire pour permettre la recombinaison V(D)J (Lieber et al., 2004) et semble aussi être le système principal de réparation induit par les IR (Escribano-Diaz et al., 2013).

### 2.3 La réparation des mésappariements et des pontages intercaténaux

Le système de réparation des mésappariements de bases (*Mismatch Repair*) a évolué pour permettre de corriger les mésappariements de bases, les boucles de délétion ou d'insertion, introduites durant la réplication. Le MMR peut augmenter la fidélité apparente de la réplication simplement en corrigeant les erreurs des ADN polymérase, induites par exemple par une activité de relecture (ou *proofreading*) défectueuse de ces dernières (Iyer et al., 2006). Ces erreurs ou ces mésappariements peuvent être identifiés par ce système grâce à la déformation de la structure locale de la double hélice d'ADN. (Crouse, 2012; Hsieh, 2001; Kunkel and Erie, 2005). Des défauts dans le système MMR sont l'une des causes, entre autre, du cancer colorectal héréditaire non-polypeux et peuvent également participer à la formation sporadique de tumeurs (Harfe and Jinks-Robertson, 2000).

Enfin, les pontages intercaténaire (ICL) font parties de lésions le plus toxiques et dangereuses, simplement en raison du blocage des processus de transcription ou de réplication, qui nécessitent une ouverture de la double hélice de l'ADN. En raison de la complexité de ce type de dommages, plusieurs facteurs et systèmes de réparation, dont le NER, pourraient prendre en charge la réparation de ce type de lésions, mais de façon concertée (Muniandy et al., 2010; Wood, 2011).

### **3. La réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER) des photodommages dimériques CPD et 6-4PP**

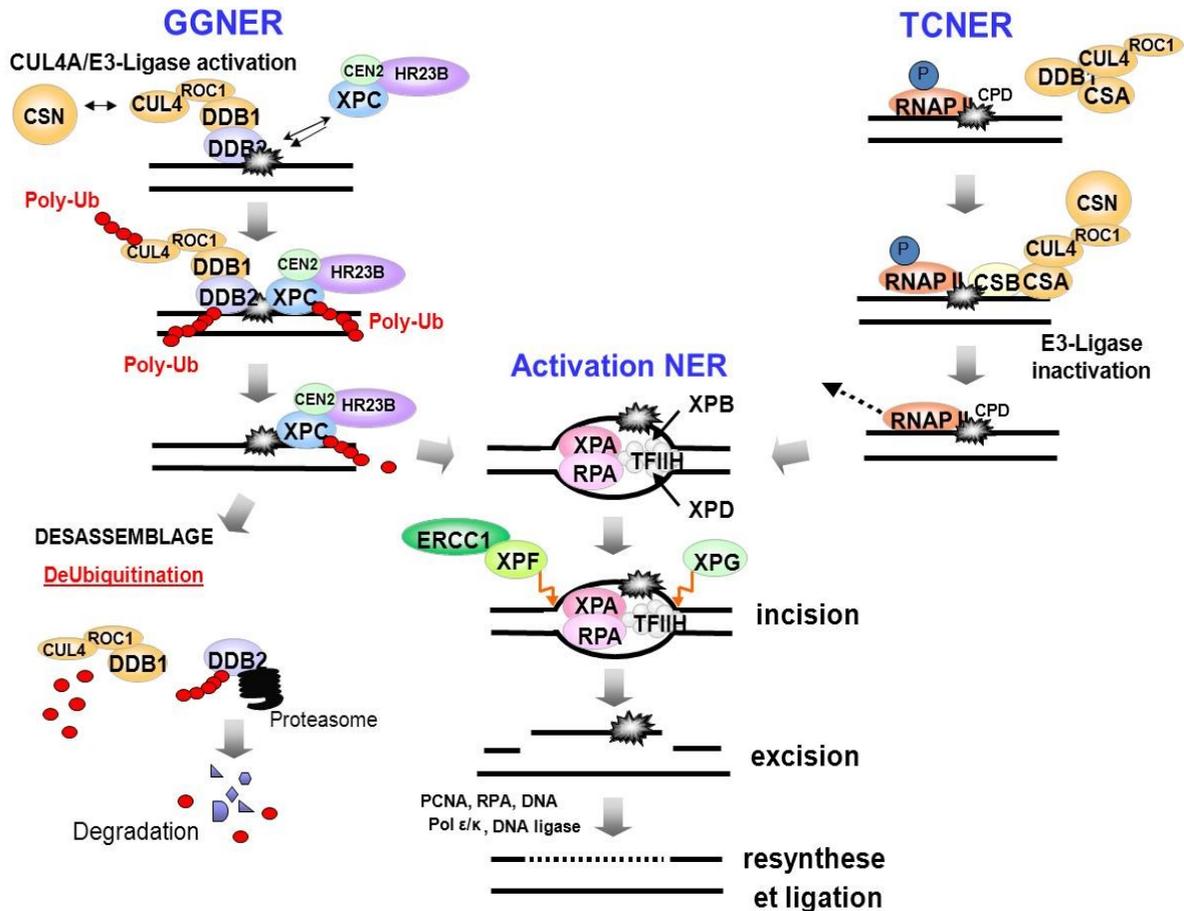
#### **3.1 Les sous voies de réparation par excision de nucléotides : La réparation NER globale (GGNER) et la réparation NER couplée à la transcription (TCNER)**

L'élimination des lésions à l'ADN entraînant une distorsion de la double hélice d'ADN est assurée par le système de réparation NER. Le NER est le système principal et exclusif de réparation des photodommages dimériques, les CPD et les 6-4PP. Ce mécanisme de réparation est fortement conservé au cours de l'évolution des procaryotes jusqu'aux cellules de mammifères et ce même si les enzymes, ou facteurs impliqués, diffèrent entre les procaryotes et les eucaryotes (Hoeijmakers, 1993a; Hoeijmakers, 1993b; Pakotiprapha et al., 2012). L'existence de l'excision des CPD fut co-découverte grâce aux travaux des équipes de R. Stelow, P. Howard-Flanders et P. Hanawalt (Boyce and Howard-Flanders, 1964; Howard-Flanders et al., 1964; Pettijohn and Hanawalt, 1964; Setlow and Carrier, 1964). En effet, ce mode de réparation ubiquitaire fut découvert en premier lieu chez les procaryotes, dont *E.coli* (Howard-Flanders et al., 1964; Pettijohn and Hanawalt, 1964; Setlow and Carrier, 1964), puis fut identifié par la suite dans les cellules humaines (Cleaver, 1968; Setlow et al., 1969), grâce à l'existence des maladies ou syndromes comme la Xérodémie Pigmentaire XP (*Xeroderma Pigmentosum*), qui seront abordés dans les sections suivantes. En effet, les participations et les identifications des facteurs NER ont pu être validées par complémentations biochimiques à partir d'extraits protéiques des patients affectés de Xérodémie Pigmentaire, menant au rétablissement de l'activité de réparation NER (Wood et al., 1988). La réparation de l'ADN par le NER est un mode de réparation multi-protéique, inductible et faisant intervenir aux

moins 30 protéines différentes. Globalement, cette réparation s'effectue par le déroulement d'étapes moléculaires consécutives et séquentielles suivantes :

- (i) Reconnaissance du dommage et courbure de l'ADN.
- (ii) Etape d'incision de l'ADN.
- (iii) Etape de resynthèse et de ligation.

Ces étapes moléculaires peuvent être reconstituées *in vitro*, sur un fragment d'ADN endommagé, à partir des facteurs NER purifiés (Aboussekhra et al., 1995; Sancar, 1996). La réparation NER est une réaction asymétrique, car l'incision de l'ADN et l'excision ne s'effectuent que sur le brin d'ADN endommagé. En plus d'être asymétrique, la réparation NER n'est pas uniforme sur l'ADN génomique. En effet, l'efficacité de réparation par le NER varie sur l'ensemble du génome et selon le type de lésions à éliminer. L'efficacité de réparation des CPD n'est pas la même selon leur localisation, à savoir s'ils se trouvent dans des régions transcriptionnellement actives ou sur des régions non actives. Ces différences de réparation ont permises de mettre en lumière l'existence de deux sous voies de réparation NER, la sous voie NER de réparation globale, qui désigne la réparation NER sur l'ensemble du génome (GGNER) et la sous voie NER qui désigne la réparation NER couplée à la transcription (TCNER). Ces deux sous voies, comme nous le verrons, diffèrent seulement au niveau de l'étape de reconnaissance du dommage, et convergent vers la voie commune NER, **Schéma 6**, (Hanawalt, 2002).



**Schéma 6:** Les sous voies et le mécanisme de la réparation par excision de nucléotides dans les cellules humaines. Adapté de (Auclair et al., 2009).

### 3.1.1 La voie de réparation NER globale (GGNER)

La voie de réparation NER globale ou GGNER, assure la réparation des dommages sur l'ensemble du génome, dans les régions transcriptionnellement inactives. Cependant, la réparation GGNER montre des différences d'efficacité de réparation, qui pourraient être influencées par la structure chromatinienne et par l'environnement chromatinien (Feng et al., 2003). D'une espèce à l'autre, l'efficacité du GGNER peut également différer. Par exemple, les cellules humaines sont normales pour l'élimination des CPD par le GGNER alors que cette élimination est déficiente chez les rongeurs, induite par leur incapacité à induire le gène GGNER DDB2. Ce phénomène est parfois dénommé le «rodent repairadox» (Hanawalt, 2001). Contrairement aux cellules humaines, cette déficience ne se traduit pas chez les

rongeurs par une altération sévère de la survie cellulaire après une exposition aux UV. De plus, l'étape de reconnaissance dans les cellules humaines est plus complexe que chez les procaryotes. Même si le mécanisme de reconnaissance du dommage par NER est encore matière à discussion, les sous voies NER n'impliquent pas les mêmes facteurs pour cette reconnaissance et sont spécifiques pour chaque sous voie (Noussipiel, 2009).

### 3.1.2 La sous voie de réparation NER couplée à la transcription (TCNER)

La sous voie de réparation couplée à la transcription TCNER est, tout comme la sous voie GGNER, bien conservée dans l'évolution. Lors de la découverte de l'existence de cette voie, il fut montré que les CPD dans les régions transcriptionnellement actives sont éliminés beaucoup plus rapidement, jusqu'à 4 à 5 fois plus vite que dans les régions transcriptionnellement inactives. Il est logique de penser qu'un dommage présent sur l'ADN en cours de transcription puisse être délétère pour la réponse cellulaire aux dommages, par exemple, et ceux-ci doivent être donc éliminés plus efficacement dans les régions actives au niveau de l'expression. D'ailleurs, la caractéristique moléculaire essentielle du TCNER, est l'arrêt de l'ARN polymérase II, au niveau du dommage, sur le brin en cours de transcription (Mellon et al., 1987). Les autres ARN polymérases ne semblent toutefois pas médier une réponse TCNER (Bohr et al., 1985; Christians and Hanawalt, 1993; Dammann and Pfeifer, 1997). Chez l'homme, une déficience en réparation TCNER va conduire aux syndromes de Cockayne CS-A et CS-B, qui étonnamment, n'entraînent pas la formation de cancer. Cependant, les syndromes CS ne révèlent pas seulement une incapacité TCNER, qui consiste finalement à restaurer la transcription génique après l'induction de dommages mais ils pourraient plutôt révéler une défaillance plus large de la réponse transcriptionnelle après une exposition aux UV (Fousteri and Mullenders, 2008; Lagerwerf et al., 2011). Cette défaillance plus étendue pourrait être associée à la neurodégénérescence observée, et révéler, aussi, un défaut de réparation des dommages oxydatifs endogènes (Cleaver and Revet, 2008). La sous voie TCNER est souvent perçue comme un mécanisme protecteur contre les agents génotoxiques qui permet aux cellules de contrecarrer les effets fortement létaux de l'inhibition prolongée de la transcription.

### 3.2 Les Modèles d'assemblage des facteurs NER

Comme précisé dans la section précédente, l'arrêt du complexe transcriptionnel de l'ARN polymérase II, au niveau de la lésion, est suffisant pour déclencher le recrutement des facteurs du TCNER aux sites de dommages, alors que les signaux nécessaires au recrutement des facteurs GGNER sont plus complexes et leur exactitude est encore mal définie. Ce dernier ne nécessite pas de facteur métabolique pour son activation mais nécessite des facteurs NER spécifiques. En fait, la simplicité des étapes de reconnaissance TCNER et GGNER, même si celles-ci sont connues depuis longtemps, n'est qu'apparente. En effet, l'idée que la réaction NER consiste seulement en l'enchaînement séquentiel d'étapes enzymatiques successives semble aujourd'hui un peu trop simpliste et ne permet pas d'expliquer certaines observations expérimentales et, plus particulièrement, dans le contexte chromatinien. L'ordre exact des étapes pourrait être plus flexible. Ces dernières années, plusieurs études ont évaluées et conceptualisées les mécanismes de l'assemblage du NER. Schématiquement, la lésion est premièrement reconnue par le complexe de reconnaissance, puis l'ADN est ensuite déroulé pour former un complexe ouvert permettant l'excision de la région contenant la lésion. Puis, cette lacune ainsi formée sera comblée par le complexe de resynthèse et de ligation. Jusqu'à aujourd'hui, le comportement ou l'action dynamique des facteurs NER reste mal défini. Il existe toutefois 3 modèles d'assemblages en vigueur du NER sur l'ADN endommagé.

Le modèle de liaison concerté: L'existence potentielle d'un modèle concerté de reconnaissance suggère que les protéines sont modérément spécifiques pour l'ADN endommagé. Dans ce modèle, les facteurs du NER stimulent, par leur liaison, l'assemblage des autres facteurs NER (Wakasugi and Sancar, 1999). L'existence d'un tel modèle nécessite plus de validations expérimentales.

Le modèle du réparosome: Dans ce modèle, les facteurs du NER sont assemblés en un gros complexe pouvant contenir plus de 6 facteurs NER (Friedberg, 1996; Svejstrup et al., 1995). Ce complexe, dénommée réparosome, pourrait scanner continuellement l'ADN génomique à la recherche de dommages distordant la double hélice d'ADN. Néanmoins, ce modèle, semble

incompatible avec la vitesse de dissociation et de diffusion des facteurs du NER aux sites de dommages. Son existence n'a jamais pu être mise en évidence (Araujo et al., 2001; Guzder et al., 1996).

Le modèle de liaison séquentielle : Enfin, dans ce modèle, les facteurs du NER se lient séquentiellement au site de réparation NER. Ce dernier semble le plus vraisemblable et compatible avec les observations dynamiques de la réaction NER. En effet, plusieurs études ont rapportées et validées l'existence de ce modèle, par utilisation de fusions fluorescentes (GFP) avec les facteurs du NER, qui permirent des observations *in vivo*. Ces études ont montrées notamment que les facteurs du NER diffusent librement dans le noyau et deviennent immobilisés transitoirement au site de dommage CPD (Essers et al., 2006; Hoogstraten et al., 2008; Houtsmuller et al., 1999; Politi et al., 2005; Volker et al., 2001). L'existence d'un tel modèle séquentiel d'associations et dissociations dynamiques des facteurs NER permet une plus grande flexibilité et rapidité d'exécution (Guzder et al., 1996). Globalement, dans ce modèle, en absence de photodommages, les protéines du NER exhibent des vitesses de diffusion rapides dans le noyau. En présence du CPD, ces protéines auraient une plus grande efficacité de liaison pour cette structure, intermédiaire de réparation. Cette dynamique de liaison ne s'applique cependant pas pour tous les facteurs NER (Dinant et al., 2009; Solimando et al., 2009).

### 3.3 Les syndromes et maladies associées à des défauts de réparation NER

Depuis longtemps, et bien avant la découverte et l'identification du système de réparation NER, les maladies liées à des défauts NER ont été décrites pour la première fois dès 1874 par F. Hebra et M. Kaposi. Ils ont décrit l'existence d'une maladie pigmentaire avec des atteintes cutanées et révélèrent un lien entre la progression de la maladie et l'exposition à la lumière solaire. Ce n'est que plus tard, en 1883, que furent rapportées des atteintes neurologiques par A. Neisser. Ce sera seulement presque un siècle plus tard, seulement, que cette maladie fut attribuée à des défauts de réparation de l'ADN notamment grâce aux travaux de J. Cleaver et R. Setlow (Cleaver, 1968; Setlow et al., 1969). Ces travaux ont notamment

permis de montrer des liens existants entre l'exposition aux UV et la progression de cancers chez les individus affectés du syndrome de xérodémie pigmentaire. Bien que cette dernière soit la première maladie associée à une déficience du NER à être identifiées, d'autres syndromes furent par la suite reliés à une défaillance NER. Toutes ces maladies ont des profils cliniques hétérogènes et chevauchants, associés avec le cancer, la neurodégénérescence, le vieillissement précoce et le retard du développement. A ce jour, on compte finalement 6 maladies humaines liées à des anomalies de la réparation par excision de nucléotides, tels que le syndrome XP, le syndrome variant de xérodémie pigmentaire (XP-V), le syndrome de Cockayne (CS), syndrome squelettique cérébro-oculo-facial (CoFS), TTD et le syndrome de sensibilité aux UV (UVSS). Cependant, les syndromes XP, CS et la trichothiodystrophie (TTD) sont liés directement à une défaillance du NER, les autres maladies ou syndromes sont des maladies plus complexes et encore mal caractérisées (Cleaver, 2005; Cleaver, 2012; Cleaver et al., 2009; de Boer and Hoeijmakers, 2000; Nakazawa et al., 2012; Schwertman et al., 2012). L'importance clinique de la réparation est largement représentée et démontrée par les syndromes XP, CS et TTD, qui sont principalement caractérisés par une extrême sensibilité au soleil et l'apparition de taches de rousseur sur les zones cutanées exposées (Cleaver et al., 2009).

### 3.3.1 Les syndromes de xérodémie pigmentaire (XP)

La maladie de xérodémie pigmentaire (*Xeroderma Pigmentosum*), parfois dénommée maladie des «enfants de la lune», est une maladie génétique autosomique récessive, rare, caractérisée par une incidence élevée de cancers cutanés (200 fois plus que le moyenne), de cancers des membranes muqueuses (épithéliomes). A titre d'exemple, cette maladie à une occurrence de 1/250 000 en Europe de l'ouest et Amérique du nord et aussi 1/20 000 au Japon (Lehmann et al., 2011). Les individus porteurs de l'allèle récessif ne présentent pas de symptômes cliniques de XP. Souvent, les syndromes XP s'observent dès les premières expositions aux rayons UV environnementaux dans les deux premières années de vie. Des liaisons de consanguinité familiales ou parentales sont souvent observées chez les individus XP. Le mort survient généralement dans la vingtaine et il n'a pas de traitements curatifs de ces

maladies (Kraemer et al., 1987). L'analyse des individus affectés par le XP ont, entre autre, permis de comprendre et de mieux caractériser le système de réparation NER au niveau moléculaire. Il existe 7 formes ou groupes distinctes de syndromes XP, dénommés aussi groupe de complémentation, qui sont classifiés de A à G tels que XP-A, XP-B, XP-C, XP-D, XP-E, XP-F et XP-G. Un 8<sup>e</sup> groupe viendra plus tard s'ajouter comme nous le verrons en deuxième partie de cette thèse, le groupe XP-V (Lehmann et al., 2011).

Chaque groupe de complémentation correspond à une perte de fonction protéique essentielle au mécanisme moléculaire de la réparation NER et présente des différences de distribution dans la population mondiale. En Amérique du nord, les groupe XP-C représentent 1/3 des patients XP, alors qu'en Europe les groupes XP-A et XP-C sont les plus représentés. Les maladies XP, CS et TTD ont des manifestations cliniques très différentes, notamment au niveau de la prédisposition aux cancers cutanés. La caractéristique principale des individus atteints de XP, est qu'ils sont très prédisposés au développement de cancer alors que les individus atteints de CS ou TTD ne présentent pas de prédispositions pour ces cancers. Cependant, il est possible d'observer chez les individus XP une neurodégénérescence progressive notamment pour les groupes A, B, D et G.

### 3.3.2 Le syndrome de Cockayne (CS)

Tout comme la maladie XP, le syndrome de Cockayne est une maladie autosomique récessive, rare, définie également par une sensibilité importante au soleil (Andrews et al., 1978). Contrairement aux maladies XP, ce syndrome est caractérisé par un retard de croissance et du développement, conduisant à une forme de nanisme associée à un retard mental et une microcéphalie, accompagnée aussi d'une surdité partielle ou complète. Les individus affectés du syndrome CS ont un faciès relativement typique tel que des yeux creux et des pommettes saillantes. Ces individus présentent des mutations sur les deux gènes CSA et CSB dont les produits sont impliqués dans la réparation NER couplée à la transcription (TCNER). De plus, les phénotypes CS-A et CS-B ne sont pas distinguables l'un de l'autre et peuvent présenter aussi des phénotypes cliniques XP combinés avec celui du syndrome de Cockayne (XP/CS) (Natale, 2011). Les individus atteints du syndrome de Cockayne peuvent

donc être classés en deux groupes, le groupe CS-A et le groupe CS-B, avec une incidence commune de 1/200 000 en Amérique du nord (Kleijer et al., 2008).

### 3.3.3 La maladie de trichothiodystrophie (TTD)

Tout comme pour les maladies XP et CS, le syndrome TTD est une maladie héréditaire aussi autosomique récessive et rare. Les patients atteints de TTD ne montrent pas toujours une photosensibilité cutanée importante aux UV mais présentent un retard de croissance accompagné de troubles neurologiques comme la surdité et un retard mental plus ou moins sévère. Ces individus ont la caractéristique de présenter des oreilles assez protubérantes et certaines anomalies dans la structure capillaire et cutanée (ichtyose). Moins de la moitié des individus affectés montrent des défauts de réparation de l'ADN (Faghri et al., 2008) et globalement le syndrome TTD ne se caractérise pas par une incidence élevée des cancers cutanés (Stary and Sarasin, 1996). Le TTD est souvent causé par la présence de mutations dans les gènes du NER XPD et XPB (Hashimoto and Egly, 2009). Les phénotypes cliniques XP, CS et TTD et même les phénotypes combinés dépendent du type et de la localisation de la mutation sur les gènes XPD et XPB. En effet, le phénotype XP semble plus lié aux mutations dans le site de liaison à l'ATP du facteur XPD alors que les mutations modifiant la conformation de cette protéine entraînent plutôt l'acquisition des phénotypes XP/CS combiné ou le TTD (Egly and Coin, 2011).

**Tableau 1 : Traits phénotypiques des syndromes d'un défaut de la réparation NER.**

<b>Traits Cliniques</b>	<b>Syndromes du NER</b>		
	<b>XP</b>	<b>CS</b>	<b>TTD</b>
Photosensibilité cutanée	+++	++	+/-
Icthyose	-	-	++
Cancers cutanés	++	-	-
Retard de croissance	+/-	++	+
Retard mental	+/-	++	+
Hypermutableté	+	+	+/-
Défauts réparation GGNER	++	-	+/-
Défauts réparation TCNER	++	++	+/-

(NER), Nucleotide Excision Repair ;(XP), syndrome de xérodémie Pigmentaire; (CS), syndrome de Cockayne; (TTD), syndrome de trichothiodystrophie. Adapté de (Cleaver, 2005; Cleaver et al., 2009)

### 3.4 Les étapes moléculaires du NER

#### 3.4.1 La reconnaissance des dommages photodimériques CPD et 6-4PP

##### 3.4.1.1 L'étape de reconnaissance du GGNER

Le modèle d'assemblage séquentiel des facteurs du NER, aujourd'hui admis pour le GGNER et le TCNER, suggère que des facteurs du NER doivent reconnaître le dommage initialement et être capable en plus, de l'identifier sur un grand nombre de bases. De nombreux facteurs du NER peuvent interagir avec le dommage XPE, XPC-HR23B, XPA et RPA. Le dimer XPC-HR23B semble être le premier facteur à se lier au site du dommage (Sugasawa et al., 1998). Le dimer DDB1 et DDB2 (complexe DDB, *DNA Damage Binding*), joue aussi un rôle dans cette reconnaissance du photoproduit. Ce rôle d'assistance du complexe DDB est surtout assuré par DDB2 (p48, XPE) car des mutations dans ce dernier entraînent le syndrome XP de groupe E (XP-E). Les individus atteints montrent une réduction de 50 % de l'activité GGNER (Hwang et al., 1999). Le phénotype XP-E est le phénotype le moins sévère de tous les groupes XP à l'exception du groupe XP-V. La fonction précise de DDB1 et DDB2 reste aujourd'hui encore mal définie bien qu'il est établi que DDB2 stimule la reconnaissance du dommage et qu'il soit nécessaire pour la decondensation de la chromatine au site de dommage (Jones et al., 2010; Luijsterburg et al., 2012). Le complexe DDB pourrait être associé également au remodelage de la chromatine après l'induction de dommages à l'ADN (Wittschieben et al., 2005). Vraisemblablement, le complexe DDB pourrait induire des changements de conformations de la chromatine, en induisant des modifications des protéines histones de part et d'autre du dommage rendant ainsi ce dernier plus accessible au complexe de reconnaissance XPC-HR23B (Luijsterburg et al., 2012). Les mutations dans le gène DDB1 ne semblent pas participer au phénotype XP-E (Tang and Chu, 2002) et son produit présente une localisation plutôt cytoplasmique alors que DDB2 est plutôt nucléaire (Volker et al., 2001). Le rôle exact de DDB1 reste à déterminer. En terme de mécanisme, il fut montré que DDB1 se trouve au sein du complexe Cul4A-Rbx1 pour former une ubiquitine ligase, qui associée à DDB2, se localise au site du dommage pour ubiquitiner XPC et DDB2 par polyubiquitination. Contrairement à XPC, où son ubiquitination réversible

augmente son affinité de liaison à l'ADN (El-Mahdy et al., 2006; Sugasawa et al., 2005), l'ubiquitination de DDB2 conduit plutôt à sa dégradation par le protéasome. Cette dégradation pourrait d'ailleurs permettre le recrutement des facteurs NER à XPC et ainsi déclencher les étapes subséquentes du NER. De plus, le complexe DDB1-DDB2-Cul4A-Rbx1, est aussi capable de modifier les histones H2A, H3 et H4 autour du site de dommage, ce qui faciliterait l'accès au facteur du NER dont HR23B dans les régions inaccessibles de la chromatine, et permettre ainsi une réparation efficace.

Le facteur NER XPC est un facteur critique et essentiel à la reconnaissance du dommage et à son élimination, puisque des mutations dans le gène XPC conduisent au syndrome XP du groupe C. Les individus de ce groupe, contrairement au groupe XP-E, présentent une profonde incapacité à réparer les dommages induits par les UV (Sugasawa, 2006; Sugasawa et al., 1998), indiquant une déficience presque complète du GGNER dans les cellules des patients XP-C. Remarquablement, ces derniers sont capables de réparer les CPD sur les régions d'ADN en cours de transcription indiquant que l'activité TCNER reste normale chez ces individus. Comme il fut précisé précédemment, XPC semble être le premier facteur du NER à reconnaître le dommage. *In vivo*, XPC forme, en effet, un complexe hétérotrimérique stable avec HR23B et centrin 2 (CEN2). Ces deux derniers acteurs sont incapables de se lier à l'ADN endommagé avec une haute affinité, et ce, même en l'absence de photodommages (Sugasawa et al., 2002) alors que XPC peut se lier avec une haute affinité l'ADN endommagé mais aussi l'ADN non-endommagé. Cette capacité à lier l'ADN non-endommagé avec une bonne spécificité fut assez intrigante pour un facteur protéique essentiel à l'étape de reconnaissance du dommage. Aujourd'hui, il semble que XPC reconnaît plutôt les changements de structure de l'ADN induits par le dommage que le dommage lui-même. Ce type de reconnaissance indirecte expliquerait le spectre de dommages à l'ADN réparés par le GGNER. Le facteur HR23B, lié à XPC contribuerait à la stabilisation de XPC, dont les niveaux endogènes corrèlent avec l'activité GGNER observée (Okuda et al., 2004). CEN2 est une protéine impliquée au niveau du centrosome, et ne semble pas essentielle pour l'activité GGNER *in vitro*, mais stimulerait cette activité en augmentant l'affinité du complexe XPC-HR23B pour le dommage (Nishi et al., 2005). Globalement, XPC-HR23B-centrin 2 agirait comme un senseur des mésappariements au site de dommage. Un modèle de reconnaissance des dommages à l'ADN par le GGNER en deux étapes a été proposé par le groupe japonais de

F. Hanaoka (Sugasawa et al., 2009). Dans ce modèle, le complexe NER XPC-TFIIH-XPA semble capable de scanner ou rechercher les lésions à l'ADN sur une distance de 150 nucléotides du site de liaison de XPC. La liaison de XPC sur un mésappariement, généré par un CPD par exemple, pourrait stimuler la réparation des CPD distants de ce mésappariement. Ce modèle de reconnaissance en 2 étapes du NER renforce l'efficacité et la spécificité de l'activité NER et permettrait ainsi une vérification du dommage pour éviter les incisions incongrues ou erronées. Selon ce modèle, le GGNER pourrait détecter les lésions au sein de l'ADN génomique en scannant les brins d'ADN, et ce, même sans induction de dommages. Ce modèle, élégant et sophistiqué, nécessite encore d'autres validations expérimentales *in vivo*. En conclusion, la liaison de l'hétérotrimère XPC-HR23B-Centrin 2 au site de dommage entraîne une courbure de l'ADN, favorisant le signal de recrutement des autres facteurs de réparation comme TFIIH, XPA et RPA afin d'assurer les étapes subséquentes de la réparation NER (Fuss and Tainer, 2011; Sugawasa et al., 2009). P. Hanawalt et R. Haynes ont été toutefois les premiers à proposer que la reconnaissance du dommage pourrait être déterminée par la conformation du dommage au sein de l'ADN ou dépendrait de sa capacité à déformer la double hélice de l'ADN (Hanawalt and Haynes, 1965). Par la suite R. Isaacs and H. Spielmann ont proposé que la flexibilité de l'ADN pourrait participer à la reconnaissance des dommages (Isaacs and Spielmann, 2004). En effet, les oscillations physiques de la molécule pourraient aussi être impliquées. En effet, la présence d'un dommage sur l'ADN peut entraîner un changement dans l'amplitude de ces oscillations et ainsi faciliter la reconnaissance par XPC. Cette observation suggère que XPC serait un senseur des oscillations anormales de la molécule d'ADN et qu'il ne serait donc pas uniquement impliqué dans la reconnaissance du GGNER mais aussi dans celle du BER et celle du NHEJ (Sugasawa et al., 2009).

En conclusion, il semble aujourd'hui que la reconnaissance de la lésion par le NER implique et nécessite l'action de XPC, le complexe UV-DDB et TFIIH (Coin et al., 2007; Fuss and Tainer, 2011; Jones et al., 2010; Sugawasa et al., 2009). Le complexe UV-DDB pourrait même favoriser la réparation au niveau de l'ADN entre les nucléosomes, en stimulant la présence et persistance de XPC sur ces sites (Fei et al., 2011).

### 3.4.1.2 L'étape de reconnaissance du dommage par le TCNER

L'arrêt de l'ARN polymérase II (Pol II), induit par la présence du dommage sur le brin en cours de transcription, est le signal principal de déclenchement du TCNER. Une fois arrêtée au niveau de la lésion, l'ARN Pol II est phosphorylée à l'extrémité C-terminale et aussi polyubiquitinée grâce à l'intervention des facteurs du TCNER, CSB et CSA. En effet, des mutations dans les gènes TCNER CSA et CSB conduisent chez l'humain au syndrome de Cockayne (CS). Le facteur CSB appartient à la famille des protéines de remodelage de la chromatine SW1/SNF, et possède une activité d'ATPase et de liaison à l'ADN. CSB, une fois intégré au complexe d'élongation de la transcription, stimule l'élongation transcriptionnelle et participe à la stabilisation de l'ARN Pol II arrêtée. CSB pourrait jouer deux rôles distincts, jouer un rôle de facteur de réparation pour le reconnaissance et aussi un rôle de facteur de transcription (Anindya et al., 2010; Proietti-De-Santis et al., 2006). Il peut aussi avoir une fonction en dehors de la réparation TCNER et jouer un rôle plus générale dans le remodelage et la maintenance de la chromatine (Newman et al., 2006). Le facteur TCNER, CSA, forme un complexe ubiquitine ligase avec DDB1-Cul4A-Rbx1, et s'associe de façon CSB dépendante à l'ARN Pol II arrêtée. Cette association entraînera des modifications, comme la phosphorylation et l'ubiquitination et conduira à la dégradation ou au déplacement de l'ARN Pol II, pour permettre le recrutement du facteur CSA (Scrima et al., 2008).

Globalement, CSA et DDB2 forment des complexe ubiquitine ligase similaire, créant ainsi un lien entre le GGNER et le TCNER. Cependant, suite à l'induction de dommage, ces complexes ubiquitine ligase possèdent des activités très différentes et seraient régulés par le méga-complexe CSN (*COP9 signalosome*) via Nedd8. Alors que l'activité de complexe CSA ligase (DDB1-Cul4A-Rbx1-COP9) est inhibée précocement, pour ensuite redevenir active en fin de réparation. L'activité du complexe DDB2 est en revanche activée immédiatement (Groisman et al., 2003). Il s'avère que CSB se lie à CSA en début de réparation et qu'en fin de processus, le complexe CSA ligase sera capable de polyubiquitiner CSB, conduisant cette dernière vers la voie de dégradation. Cette dernière serait d'une grande importance pour la récupération la transcription, essentielle à la survie cellulaire (Groisman et al., 2006).

Néanmoins, de nouveaux joueurs sont venus s'ajouter à cette étape de reconnaissance, la protéine UVSSA (*UV-Sensitive Syndrome protein A*) et la déubiquitinase HAUSP/USP7

(Cleaver, 2012; Sarasin, 2012; Schwertman et al., 2012). Ces nouveaux acteurs semblent nécessaires à la régulation de l'activité du TCNER en agissant sur CSB (Schwertman et al., 2012). Plus exactement, CSB est recrutée au niveau de l'ARN Pol II arrêtée au site du dommage puis les complexe CSA et UVSSA sont ensuite recrutés et vont fonctionner comme ubiquitine ligase ou déubiquitinase respectivement (Anindya et al., 2010; Nakazawa et al., 2012; Saijo, 2013).

En ce qui concerne le phénotype du syndrome de Cockayne (groupe A et groupe B), une déficience profonde dans l'élimination des lésions sur le brin transcrit par le TCNER fut longtemps la raison principale de la maladie et explique la sensibilité aux UV, certainement causée par une incapacité à restaurer la transcription. Comme déjà mentionné, il s'avère que CSB pourrait ne pas être spécifique au TCNER mais pourrait jouer un rôle dans d'autres systèmes de réparation de l'ADN, car les patients CS-B démontrent également une sensibilité importante aux dommages oxydatifs et les radiations ionisantes. Actuellement, il est admis que CSB pourrait affecter la structure de la chromatine de l'ADN et donc moduler par ce moyen la réparation et d'autres types de lésions. Une fois la lésion reconnue par les facteurs de reconnaissance du TCNER, l'étape suivant consistera au recrutement des facteurs du NER et la formation d'un complexe ADN ouvert ou complexe de pré-incision, pour permettre l'élimination de la lésion.

#### 3.4.2 Le recrutement des facteurs NER et formation du complexe de pré-incision

Après l'étape de reconnaissance par XPC-HR23B-CEN2 ou par CSA et CSB, le mode de recrutement des facteurs NER est un mécanisme commun aux deux sous voies du GGNER et TCNER, qui est initié par l'arrivée du facteur TFIIH au site de dommage. TFIIH est un facteur basal du complexe d'initiation transcriptionnelle de Pol II. Plus précisément, la sous unité TFIIH est formée de 9 protéines (Cdk7, cycline H, MAT1, p89, p80, p34, p44, p52 et p62) associé à CAK (*CDK-Activating Kinase*) (Zhu et al., 2012). Les protéines TFIIH p89 et p80 sont désignées respectivement XPB et XPD, et comme leur nom l'indique, leur déficience conduit au syndrome de xérodémie pigmentaire du groupe B et du groupe D et sont des

facteurs essentiels à l'activité NER. Les facteurs XPB et XPD possèdent des activités hélicases, 3'-5' et 5'-3' respectivement, qui leur permettront de dérouler la double hélice d'ADN. Leurs activités hélicases sont ATP dépendantes. Au niveau pathologique, les individus atteints du syndrome XP-B et XP-D présentent une très faible activité NER ainsi qu'une forte instabilité chromosomique aux UV. Les activités hélicases de XPB et XPD sont en effet essentielles à la fonction du NER pour la reconnaissance et la vérification du dommage (Fuss and Tainer, 2011; Sugasawa et al., 2009), mais aussi dans l'initiation de la transcription. Il n'est donc pas étonnant que les syndromes XP-B et XP-D soient des formes XP rares, en raison de la non-viabilité cellulaire des défauts sévères de la transcription (Compe and Egly, 2012). Les patients XP-B et XP-D présentent plutôt des phénotypes combinés XP ou CS et plus rarement TTD (Botta et al., 2002; Egly and Coin, 2011). L'implication de ces hélicases dans la transcription et la réparation fait de celles-ci un centre critique de contrôle de la reconnaissance du dommage et de sa vérification (Mathieu et al., 2010; Zhu et al., 2012). En effet, les interactions XPB, XPD et CAK pourraient permettre la coordination de la réparation, du cycle cellulaire avec la transcription (Egly and Coin, 2011; Fuss and Tainer, 2011).

XPA, ainsi que RPA, sont des facteurs d'une importance capitale pour le GGNER et TCNER. En effet, RPA est une petite protéine en doigt de Zinc, et fut initialement proposée comme le senseur principal des dommages à l'ADN, simplement en raison de sa capacité à reconnaître le dommage sur l'ADN endommagé mais aussi du fait qu'en son absence, le complexe de pré-incision ne peut pas se former. A présent, XPA est plutôt vu comme un facteur secondaire de reconnaissance du dommage ou comme un facteur de vérification du dommage (Saijo et al., 2011; Sugasawa et al., 1998; Missura et al., 2001). RPA, en revanche est un hétérotrimère, composé de RPA1 (70 kDa), RPA2 (32 kDa) et RPA3 (14 kDa), ayant une grande affinité de liaison pour l'ADN simple brin dont la liaison sur ce dernier à une fonction stabilisatrice de cette structure. Sa capacité stabilisatrice de l'ADN simple brin lui confère un rôle majeur dans le métabolisme de l'ADN puisqu'il intervient dans la réplication, la recombinaison et la réparation. La liaison de RPA au complexe ouvert de l'ADN consiste surtout à le protéger de l'attaque des endonucléases lors de l'étape d'incision par les autres facteurs du NER. RPA semble avoir également un rôle primordial dans l'activité du NER mais aussi dans la coordination avec la réplication (Hass et al., 2012; Oakley and Patrick, 2010). De

plus, RPA peut réguler ;le nombre d'incision NER dans les cellules quiescentes (Overmeer et al., 2011).

Comme nous le verrons, l'absence du facteur XPA, conduisant au syndrome XP-A, est une forme très sévère de xérodémie pigmentaire puisque les individus XP-A sont incapables d'éliminer les photodommages sur l'ADN transcriptionnellement actif et inactif. Leur déficience GGNER et TCNER profonde confirme le rôle central de XPA dans la voie commune du NER. Il faut toutefois noter qu'il existe deux classes cliniques au syndrome XP-A, pouvant être différenciées par la présence d'atteintes neurologiques sévères. Les cas XP-A les plus sévères présentent des mutations sur les deux allèles du gène XPA alors que les individus les moins affectés cliniquement présentent une mutation dans un seul allèle seulement.

#### 3.4.3 Etape de recrutement des endonucléases et incision de l'ADN endommagé

Après l'assemblage du complexe de pré-incision, l'incision peut être maintenant effectuée grâce aux endonucléases spécifiques XPG, ERCC1-XPF. Cette étape est d'ailleurs dénommée étape d'incision double (*dual incision*), car les endonucléases incisent en 3' et aussi en 5' de part et d'autre du dommage. Le complexe hétérodimérique ERCC1-XPF est un complexe stable formé de deux endonucléases ERCC1 (35 kDa) et XPF (103 kDa), qui incise en 5' de la lésion, approximativement de 15 à 25 nucléotides en amont de la lésion. Le facteur XPG est une endonucléase, effectuant la coupure simple brin en 3' du dommage. Cette endonucléase, tout comme le complexe ERCC1-XPF est essentielle à l'étape d'incision. Il existe des évidences que XPG serait également nécessaire à la formation du complexe de pré-incision même en absence de XPA (Evans et al., 1997). En fait, ces deux endonucléases ne semblent pas s'associer de façon concomitante mais dépendent plutôt l'une de l'autre. Le recrutement de XPG ne semble toutefois pas suffisant à son activité endonucléase puisqu'en absence de XPA, aucune activité d'incision n'est détectée. XPG pourrait même être déjà présent dans le complexe de pré-incision avant l'arrivée de XPA et que ce sont les interactions XPA-RPA-XPG qui stabiliseraient la structure de pré-incision (Araujo et al., 2001). XPG

serait donc la première endonucléase à arriver au site du dommage probablement dans le complexe de pré-incision. Une fois XPG positionné, l'hétérodimère ERCC1-XPF viendrait se joindre au complexe de pré-incision. A ce jour, l'ordre séquentiel du clivage en 5' et/ou 3' n'est pas encore clairement défini même si XPG clivera en premier en 3' suivi du clivage en 5' par ERCC1-XPF (Fagbemi et al., 2011; Graf et al., 2011). De plus, ERCC1/XPF intervient aussi dans la réparation des cassures DSB, la recombinaison et la réparation des pontages intercaténaux et aussi dans la maintenance des télomères (Kirschner and Melton, 2010).

L'étape d'excision aboutit invariablement à l'excision du brin endommagé sous forme d'un oligonucléotide de 24 à 30 nucléotides, cependant, le devenir de cette molécule reste encore obscure. Différentes destinées furent toutefois proposées, comme sa dégradation dans le cytoplasme ou sa participation comme signal déclencheur de la mélanogenèse, mécanisme protecteur contre les UV.

Les syndromes XP-G et XP-F sont également des maladies rares. Le syndrome XP-F, dont la grande majorité des cas fut rapporté au Japon (Moriwaki and Kraemer, 2001) où les individus présentent une activité NER réduite, de la même façon que pour le syndrome XP-C. Néanmoins, contrairement à XPG et XPF, un défaut fonctionnel ERCC1 ne conduit pas au syndrome XP mais semble plutôt conduire au syndrome Squelettique Cérébro-oculo-Facial de type 4 (CoFS4), qui est un syndrome récessif autosomique qui affecte le système nerveux central avec des atteintes de la moelle épinière, centrales et oculaires. Les individus CoFS4 semblent avoir une activité NER modérément réduite avec des mutations additionnelles dans les gènes CSB, XPD et XPG (Jaspers et al., 2007). Jusqu'à l'identification récente de la cause du syndrome CoFS4, aucune maladie n'avait été associée avec un défaut ERCC1. Il est toutefois encore trop tôt pour affirmer que ces patients forment un nouveau groupe de complémentarité NER (Gregg et al., 2011). Une déficience fonctionnelle du complexe ERCC1/XPF dans la réparation des pontages intercaténaux pourrait aussi contribuer au phénotype clinique observé chez les individus CoFS4. (Bhagwat et al., 2009; Shivji et al., 1992).

#### 3.4.4 L'étape de resynthèse et de ligation (*gap-filling*)

Suivant l'étape d'excision, la lacune de 24 à 30 nucléotides sur l'ADN a besoin d'être comblé. Cette activité de resynthèse sera assurée par une ADN polymérase et une ligase. Les extrémités 3'-OH, générées par l'excision en 5' sont suffisantes et nécessaires pour le comblement de la lacune par l'ADN polymérase. Plus exactement, cette resynthèse est assurée par les ADN polymérases répliquatives Pol  $\delta$ ,  $\epsilon$  et par l'ADN polymérase translésionnelle Pol  $\kappa$ , le tout en présence de RPA, RFC et PCNA (voir deuxième partie de cette thèse), (Hochwagen and Amon, 2006; Shivji et al., 1992; Ogi et al., 2010).

Plus particulièrement, PCNA viendrait former un clamp moléculaire autour de l'hélice d'ADN et recruterait lui-même RFC (*Replication Factor C*) et les ADN polymérases citées précédemment (Aboussekhra et al., 1995; Overmeer et al., 2010; Shivji et al., 1992). Une fois l'ADN resynthétisé, les extrémités d'ADN vont pouvoir être jointes ou liguées entre elles. Pendant longtemps, il fut envisagé que seule l'ADN ligase I pouvait effectuer cette étape de ligation (Aboussekhra et al., 1995), mais il a été rapporté que en plus de la ligase I, l'ADN ligase III et son partenaire XRCC3, feraient partie intégrante de la voie NER. En effet, le complexe XRCC3-Ligase IIIa pourrait être aussi recruté au niveau du site de dommage. De plus, un défaut de la ligase IIIa entraînerait une inhibition de l'élimination des 6-4PP et de la resynthèse d'ADN. Cependant, la ligase IIIa est activée tout au long de la progression cellulaire alors que la ligase I serait plus impliquée en phase S ou en phase G1 tardive du cycle cellulaire (Moser et al., 2007).

#### 3.5 L'efficacité de réparation des photodommages CPD et 6-4PP

Les deux types de photodommages principaux induits par les UV étant les CPD et les 6-4PP, leur formation dépendra essentiellement de la séquence d'ADN et de l'environnement chromatinien. Les 6-4PP ont la particularité d'être de 5 à 10 fois moins fréquents que les CPD et contrairement à ces derniers, ils n'induisent pas les mêmes altérations ou déformations de la structure de la double hélice d'ADN. Comme il fut précisé avant, les 6-4PP ont la particularité d'induire une déformation de l'ADN beaucoup plus importante de la double hélice, ce qui leur

confèrera globalement une réparation plus rapide. En effet, 50-80% des 6-4PP sont réparés dans les 5 premières heures suivantes l'exposition UV, alors que seulement 50-60 % des CPD sont réparés en 24-48 h seulement après l'induction de dommages dans les cellules humaines (Mitchell et al., 1985; Mitchell and Nairn, 1989). Cette rapidité de réparation des 6-4PP par le GGNER suggère qu'ils sont mieux reconnus par le NER. Cette différence d'efficacité indique aussi que les CPD semblent plus tolérés par la cellule et, que la réparation précoce du GGNER, au moins dans les premières heures suivantes l'exposition aux UV, reflète plutôt la réparation des 6-4PP que celle des CPD.

Ces deux types de photoproduits semblent être des lésions pro-mutagènes, c'est à dire qu'ils pourront contribuer à la carcinogenèse s'ils ne sont pas éliminés de l'ADN. Les 6-4PP sont des déterminants importants des effets toxiques et mutagènes induits par les UV. De plus la persistance des 6-4PP, entrainera des effets délétères et toxiques plus sévères que les CPD (Brash, 1988; Mitchell, 1988) et ainsi jouer un rôle important dans la formation de cancers de la peau, en particulier chez les patients affectés de XP (Otoshi et al., 2000). Les mécanismes ou les raisons pouvant expliquer cette meilleure reconnaissance des 6-4PP par rapport aux CPD peuvent être multiples et peuvent aussi s'effectuer à plusieurs niveaux et sont encore matière à débat. Cependant, la déstabilisation de la double hélice induite par les 6-4PP et la fonction connue de DDB2 et XPC pourraient toutefois apporter quelques explications sur les causes probables de cette meilleure reconnaissance par le GGNER. Le complexe DDB1-DDB2 pourrait, en fait, faciliter la reconnaissance des 6-4PP. Le complexe UV-DDB possède une forte affinité pour les CPD et les 6-4PP sur l'ADN endommagé, contrairement à XP-C et ce comportement pourrait expliquer cette différence d'efficacité de réparation. Les cellules provenant de patients XP-E présentant des mutations DDB2, exhibent une déficience importante d'élimination des CPD et seulement une différence légère de la réparation des 6-4PP. Cette observation indique que DDB2 n'est peut-être pas si nécessaire à la réparation de 6-4PP par le GGNER mais plutôt nécessaire à la réparation des CPD, même s'il fut toutefois démontré, *in vitro*, que DDB2 n'est pas essentiel à la réparation de ces derniers, contrairement aux observations *in vivo* (Hwang et al., 1998; Reardon and Sancar, 2003). Cette contradiction renforce un rôle probable du complexe DDB dans la relaxation locale de la chromatine via DDB2, et favorisera ainsi la reconnaissance du dommage par XPC. En conclusion, il semble DDB2 n'est pas essentiel au recrutement rapide des facteurs du NER aux sites 6-4PP mais

essentiel pour la persistance des facteurs NER au site de réparation CPD (Fei et al., 2011; Oh et al., 2011). La réparation très efficace des 6-4PP, par rapport aux CPD, peut être expliquée localement, d'une part par les déformations de la double hélice et aussi en raison de l'effet négligeable de cette relaxation de la chromatine sur la réparation des 6-4PP.

En effet, la distribution des photodommages va dépendre de l'état de relaxation de la chromatine. Les CPD présentent une distribution périodique de 10,3 nucléotides dans le nucléosome avec une préférence marquée pour le petit sillon de l'ADN, à l'écart de la surface des histones, alors qu'au centre du nucléosome, la formation des CPD est très réduite. Les 6-4PP montrent, quand à eux, une distribution plus uniforme dans le nucléosome (Ura and Hayes, 2002; Zhao et al., 2009) et qui semble la même que sur l'ADN nu et l'ADN linker (Ura et al., 2001).

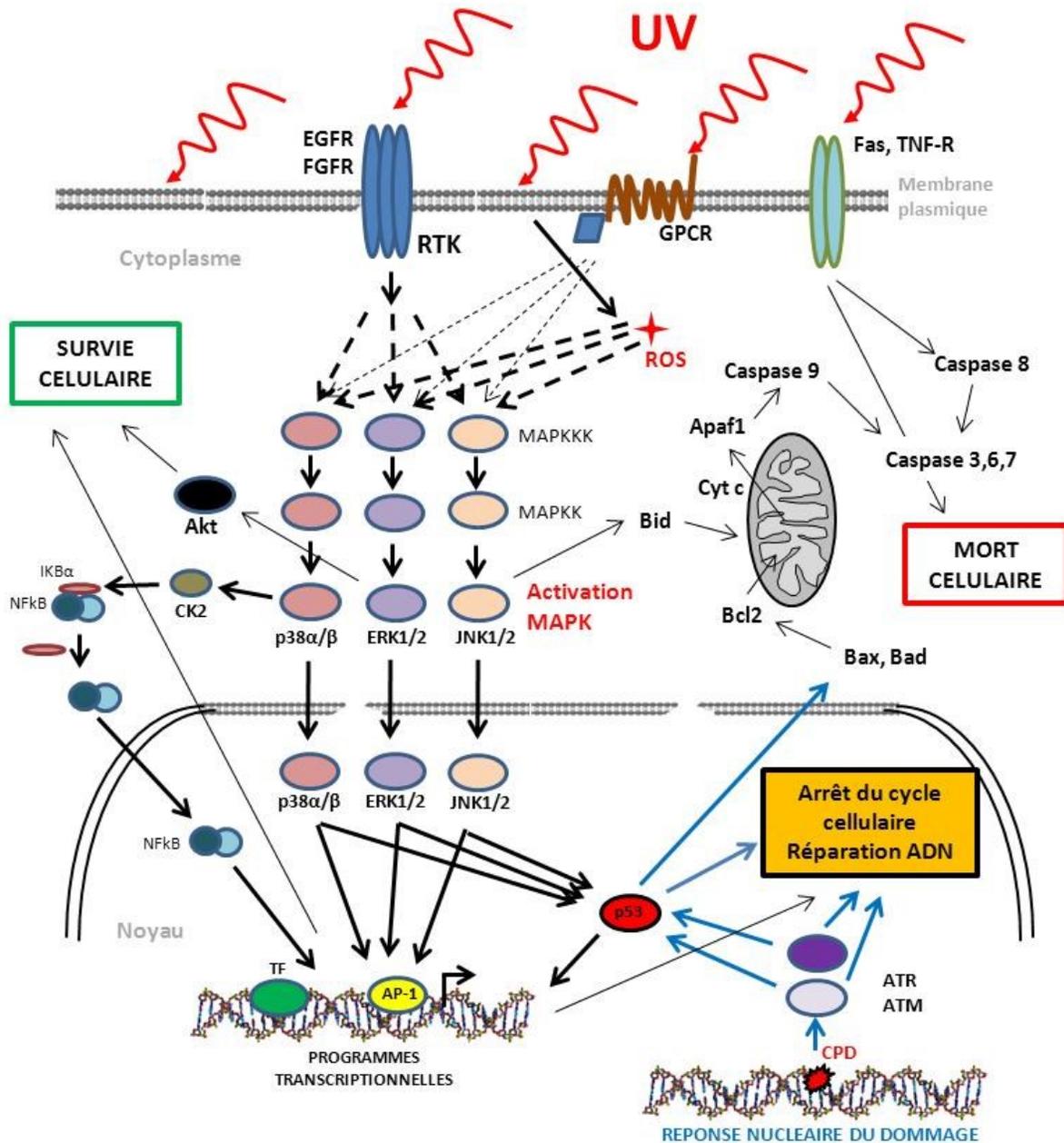
#### **4 La réponse cellulaire aux ultra-violets : La réponse UV**

Les cellules de mammifères, en plus de leur systèmes cellulaire de réparation de l'ADN, ont aussi développées toute une variété de réponses face aux nombreux stress environnementaux dans le but d'assurer simplement leur survie, de veiller à l'intégrité de leur information génétique et éviter ainsi la propagation de mutations. La présence des dommages sur l'ADN peut compromettre des processus cellulaire importants comme la régulation du cycle cellulaire, la transcription, la mort cellulaire et aussi la réparation de l'ADN, et donc mener à une instabilité chromosomique. Ces instabilités pourraient conférer des avantages prolifératifs et participer à l'apparition de cancers. L'existence des systèmes de réparation montrent que les cellules ont une certaine capacité adaptative face au stress et radiations environnementales. Les cellules sont, en effet, capables de déclencher une réponse cellulaire protectrice et adéquate, qui sera essentielle pour leur survie. Cette réponse aux agents génotoxiques se traduira généralement par un arrêt de la croissance et de la prolifération cellulaire dans le but d'éliminer les dommages à l'ADN et aussi les protéines endommagées. Cependant, si les niveaux de dommages sont trop importants, cette réponse cellulaire favorisera leur engagement vers des programmes de mort cellulaire comme l'apoptose et l'autophagie pour ne pas perpétuer les mutations.

Les réponses cellulaires aux stress génotoxiques sont principalement constituées de voies de signalisation et de senseurs de dommages conduisant à l'exécution d'évènements d'expression géniques spécifiques et adaptatifs. La réponse cellulaire à ces stress toxiques est à la fois une réponse générale et ubiquitaire mais aussi une réponse spécialisée puisqu'elle dépend de l'origine du stress (comme les radiations environnementales) et aussi du type de dommages à l'ADN.

Suite à une exposition aux UV, les cellules développent rapidement une réponse spécifique et adaptative qualifiée de réponse UV. Cette réponse, aux effets pléiotropiques, peut être caractérisée comme une réponse complexe aux UV, définie par le déclenchement de l'induction d'une multitude d'évènements d'expression génique et de signalisation cellulaire, conduisant la cellule à choisir entre divers destins cellulaires comme la survie, la croissance ou l'apoptose. Les UV entraînent une grande variété d'effets biologiques qui peuvent être bénéfiques mais aussi délétères pour les cellules ou organismes. Chez l'homme, la réponse cellulaire UV se compose de deux types de réponses principales. L'une de ces réponses est initiée au niveau noyau grâce à l'induction de dommages à l'ADN (CPD et 6-4PP) et est souvent désignée comme une réponse UV nucléaire dépendante de la présence des dommages à l'ADN, alors que la deuxième réponse est initiée au niveau de la membrane plasmique (ou du cytoplasme) et peut être qualifiée de réponse cytoplasmique ou membranaire, indépendante des dommages à l'ADN. Le compartiment cellulaire responsable de l'induction de la réponse UV a été l'objet d'une grande controverse, à savoir, si la réponse est initiée au niveau membranaire ou plutôt au niveau nucléaire. Pendant longtemps, il était envisagé que la réponse nucléaire aux dommages à l'ADN était l'initiatrice de la réponse UV (Schwarz, 1998). En effet, l'ADN en plus d'être le chromophore principal de l'absorption de l'énergie UV, il fut montré que la réduction des dommages à l'ADN est capable de supprimer cette réponse, ce qui indique que les dommages à l'ADN sont importants pour l'initiation de cette réponse. Les cellules sont toutefois capables d'induire une réponse UV en l'absence de signaux d'origine nucléaires (Devary et al., 1993). Il semble, en fait, que la réponse UV nucléaire et la réponse UV extranucléaire, ou cytoplasmique, soient générées indépendamment et ne sont pas mutuellement exclusives. Bien au contraire, il semble que ces 2 réponses participent à la réponse globale de manières additives mais aussi indépendantes. Les effets de

la réponse UV dépendent fortement de longueur d'onde UV incidente, de la prolifération mais aussi du type cellulaire (**Schéma 7**).



**Schéma 7:** Représentation schématique et simplifiée de la réponse cellulaire après une exposition aux UV: La réponse UV

Les flèches noires indiquent la réponse UV d'origine membranaire alors que les flèches bleues indiquent la réponse UV d'origine nucléaire et dépendante des dommages à l'ADN.

#### 4.1 La réponse UV dépendante des dommages CPD et 6-4PP

L'induction de CPD ou de 6-4PP sur l'ADN est capable d'induire une réponse nucléaire, en plus d'induire leur réparation (Vrouwe et al., 2011). La réponse UV nucléaire permet d'activer des voies de signalisation qui exerceront principalement un contrôle de la progression du cycle cellulaire et sur les mécanismes d'apoptose. L'absence d'un contrôle de la prolifération cellulaire après l'induction de dommage peut conduire à la fixation de mutations ou à des cassures chromosomiques, comme nous le verrons plus en détails en deuxième partie de cette thèse.

Les mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire sont, génériquement dénommés, les points de contrôle du cycle cellulaire (ou *checkpoints*). En raison de l'irréversibilité des transitions du cycle cellulaire entre les différentes phases du cycle (phase G1, S et G2), il est primordial pour la cellule de pouvoir empêcher la réplication de son ADN si celui-ci est endommagé, pour éviter la transmission de mutations ou d'aberrations chromosomiques. De plus, certains acteurs de ces points de contrôle viennent agir spécifiquement suite à l'induction de dommages ou lorsque la réplication cellulaire est arrêtée par la présence du dommage (point de contrôle en phase S : le point de contrôle S), (Kastan and Bartek, 2004; Zhou and Elledge, 2000). En effet, il est connu depuis longtemps que l'exposition des cellules aux UV entraîne un retard ou un délai de la progression cellulaire à travers les différentes phases du cycle cellulaire. Par exemple, après une exposition UV aigüe, les cellules de mammifères sont bloquées en phase G1 et G2. Seule une petite partie de ces cellules sont capables progresser alors que la fraction la plus importante entrera en mort cellulaire programmée (Bootsma and Humphrey, 1968). Ces retards de prolifération et la capacité à reprogénérer de nouveau indiquent que ces points de contrôle du cycle cellulaire fournissent aux cellules le temps nécessaire à l'élimination des dommages causés par les UV sur l'ADN. Schématiquement, l'évènement précoce de la réponse UV nucléaire semble être un évènement de remodelage de la chromatine comme la décondensation afin de rendre le dommage plus accessible et permettre la réparation de l'ADN par le NER (Murga et al., 2007). Presque de façon concomitante, il se produit un ralentissement ou un arrêt de la progression cellulaire induit par les points de contrôle de l'intégrité du génome. Ces derniers permettront entre autre d'exercer un contrôle sur la transition G1/S, et la transition G2/M, mais aussi au

sein de la phase S. L'ensemble de ces mécanismes de la réponse UV nucléaire sera décrit plus en détails en deuxième partie de cette thèse.

#### Les effecteurs du point de contrôle du cycle cellulaire, p53 et la phosphatase CDC25 :

Le suppresseur de tumeur p53, comme nous le verrons est un effecteur central dans la réponse UV. Suite à l'induction de dommages, p53 est rapidement stabilisé par phosphorylation grâce à ATR et ATM. Plus précisément, ses niveaux protéiques et de transcrits sont régulés, par modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la sumoylation, l'acétylation et la neddylation. p53 est essentiel à l'arrêt en phase G1 en réponse aux dommages à l'ADN. Il exerce ses fonctions à plusieurs niveaux puisqu'il est capable d'inhiber la transition G1/S via l'induction transcriptionnelle de p21waf1(Cdk1), inhibant l'activité cycline E/Cdk2 et l'activité Rb/E2F. p53 possède plusieurs fonctions et par conséquent ses actions sur le cycle cellulaire sont multiples et manquent encore d'exactitudes. De plus, les Cdk peuvent phosphoryler aussi p53 et ainsi réguler son action sur le cycle cellulaire. La famille de phosphatases CDC25, qui est représentée chez l'homme par CDC25A, CDC25B et CDC25C. va contribuer à déphosphoryler les Cdk et ainsi moduler les transitions du cycle cellulaire suite à l'induction de dommage à l'ADN dans plusieurs phases du cycle cellulaire comme la phase S et la transition G2/M. Les effets précis de p53 sur le cycle cellulaire et la mort cellulaire restent cependant complexes et dépendent de l'intégration d'un grand nombre de signaux émanant de la réponse UV nucléaire mais aussi de la réponse UV cytoplasmique (ou extranucléaire). Il n'existe pas encore de mécanisme consensuel pour l'activation de ces points de contrôle de la progression induite par les UV (Herrlich et al., 2008).

#### 4.2 La réponse UV extranucléaire indépendante des dommages à l'ADN

Dans la réponse UV extranucléaire, qui a aussi pour but de déclencher des programmes d'expression géniques pour permettre une réponse rapide et adaptative, les signaux extranucléaires émanent de la surface cellulaire au niveau de la membrane plasmique pour être ensuite relayés par les voies de signalisation cytoplasmiques afin d'activer un certain nombre de facteurs de transcription dans le noyau de la cellule. Ces signaux membranaires convergent

donc vers le noyau et assistent la réponse UV nucléaire dans le contrôle de la réplication, la transcription, la traduction et évidemment la mort cellulaire.

#### 4.2.1 Les signaux d'origine membranaire

Les signaux de cette réponse extranucléaire, émanant de la membrane plasmique seraient émis par les récepteurs tyrosine kinase membranaires (RTK) comme EGFR (Xu et al., 2009) et par les tyrosines phosphatases (PTK) comme SRC (Devary et al., 1992). En effet les récepteurs RTK comme EGFR, FGFR, InR et PDGFR peuvent être activés par les UV et ce, indépendamment de la présence des dommages. Ce mécanisme sera abordé plus longuement en fin de cette introduction mais serait causé, entre autre, par la génération d'espèces réactives le l'oxygène (ROS) (Gross et al., 1999; Knebel et al., 1996). En plus de l'activation RTK, il se produira également une activation des différentes voies de signalisation cytoplasmiques comme les MAPK, la voie Akt/PI3K et la voie NFκB.

#### 4.2.2 Activation de voies de signalisation cytoplasmiques

##### 4.2.2.1 Activation des voies MAPK

L'activation des voies de signalisation cytoplasmiques, tout comme l'activation des RTK membranaires, est un évènement précoce de la réponse cellulaire aux UV. Le rôle, l'implication et l'activation des voies MAPK en réponse aux UV fera l'objet d'une section entière en fin de cette introduction de thèse. Succinctement, les voies MAPK, jouent un rôle primordial et critique dans la transmission des signaux de la membrane vers le noyau, dans le but d'induire des programmes transcriptionnels spécifiques de la réponse UV.

##### 4.2.2.2 Activation de la voie Akt/PI3K

Comme il fut déjà précisé, les UV sont capables d'activer les voies de contrôle de la croissance cellulaire via les voies MAPK mais aussi via la voie de signalisation Akt/PI3K

(Gonzales and Bowden, 2002; Nomura et al., 2001). La voie Akt est une voie de signalisation importante pour la survie cellulaire et protège de l'apoptose induite par les UV. L'activation d'Akt par les UV semble être également dépendante de EGFR (Wan et al., 2001; Wang et al., 2003a). La voie Akt est capable d'induire les voies de signalisation contrôlant la synthèse protéique, par phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction 4EBP1, et exercer ainsi des effets positifs sur la traduction de messagers ARN. Akt peut aussi phosphoryler des protéines de la sous unité ribosomique, p70<sup>RSK</sup> et p90<sup>RSK</sup>, impliquées dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Bode and Dong, 2003). L'activité Akt est dépendante de la prolifération cellulaire. Dans les cellules quiescentes, Akt est localisée dans le cytosol sous forme inactive alors qu'après une exposition aux UV, Akt est rapidement activée par PDK1 grâce à l'activation EGFR et des récepteurs à protéine G (GPCR). Cette activation Akt par les UV montre que ces derniers sont capables d'induire des signaux de survie, tout comme des signaux de mort cellulaire (Wan et al., 2001).

#### 4.2.2.3 Activation de la voie NFκB

Tout comme les voies MAPK, il est bien établi que NFκB est activée par les UV, via un mécanisme toutefois différent de celui utilisé par les cytokines (Li and Karin, 1998). NFκB est un facteur de transcription dimérique formé des protéines Rel (c-rel ou RelA ou RelB) et des sous unités p50 ou p52. Sa localisation nucléaire est régulée par les protéines IκB, qui ont une action inhibitrice sur l'activation NFκB. L'association IκB avec NFκB est régulée par la phosphorylation d'IκB par le complexe IKK. D'ailleurs, lorsqu'IκB n'est pas phosphorylé, celui-ci est constitutivement lié à NFκB et permet ainsi sa rétention cytoplasmique. En réponse aux UV, NFκB peut être activé de façon indépendante à l'induction de dommage puisqu'il peut être activé par les UV dans des cellules énuclées (Devary et al., 1993; Kato et al., 2003). Cette activation NFκB par les UV semble s'effectuer en deux phases, une phase précoce (dans les deux heures post-UV) et une phase plus tardive (12 h post-UV). La phosphorylation précoce de IκB semble assurée par la caséine kinase II (CK2) et la voie MAPK-p38 et non par la kinase IKK (Devary et al., 1993). Ce mécanisme reste encore obscure et semble être considéré comme un mécanisme d'activation non canonique de NFκB (Laszlo and Wu, 2008; Wu et al., 2004). Néanmoins, il semble que NFκB puisse être aussi activée tardivement par la

présence de dommages à l'ADN et que cette activation soit impliquée dans le choix cellulaire de survie ou d'apoptose (Bender et al., 1998; Karin, 2006; Wu et al., 2004).

#### 4.2.3 Activation des programmes transcriptionnels de la réponse UV

L'ensemble des voies de signalisation nucléaires et extranucléaires de la réponse cellulaire UV converge vers l'induction de programmes complexes de transcription génique afin d'assurer une réponse rapide et adaptative. Les voies de signalisation de la réponse UV entraînent des activations transcriptionnelles d'une multitude de gènes grâce aux facteurs de transcription AP1, NFκB et p53, cités précédemment (Sachsenmaier et al., 1994a). Le facteur de transcription AP-1 est un facteur de transcription dimérique formé de la famille jun (c-jun, junD, junB), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2) et aussi ATF2 (Hess et al., 2004). Les dimères AP-1 peuvent réguler l'activation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'apoptose, la survie cellulaire et la prolifération cellulaire. Les gènes cibles des programmes transcriptionnels de AP-1 concernent notamment les gènes des cytokines, des facteurs de croissance, d'enzymes de maturation des ARN, d'apoptose dans l'unique but de permettre à la cellule de changer sa physiologie et s'adapter au mieux aux UV (Hayakawa and Okabayashi, 2004). Par exemple, le dimère ATF2/c-jun peut réguler plus de 269 gènes en réponse au traitement par le Cisplatine (Hayakawa and Okabayashi, 2004; Karin, 1995). AP-1 peut aussi moduler l'expression de nombreux régulateurs du cycle cellulaire comme la cycline E, p53, p21<sup>waf1</sup>, p19<sup>ARF</sup> mais aussi des gènes impliqués directement dans l'apoptose (Bode and Dong, 2003; Shaulian and Karin, 2002). Les sous unités du facteur AP-1 sont hautement régulées par phosphorylation grâce à la signalisation des voies MAPK, qui favorisent l'activation de AP-1 et aussi l'association de AP-1 sur le site de liaison à l'ADN dans les régions promotrices, entre autre sur les éléments de réponse TPA-RE (5'TGAGCTCA3').

Tout comme AP-1, NFκB peut réguler l'expression inductible de nombreux gènes, seuls ou en combinaison avec d'autres facteurs de transcription. NFκB se lie sur les éléments de réponse NF-B (5'GGGRNNYYCC, R représente une purine et Y représente une pyrimidine) retrouvés sur les promoteurs (Zabel et al., 1991) L'action de NFκB semble être

plutôt anti-apoptotique suite à l'induction de dommage à l'ADN induits par les UV (Chen and Greene, 2004).

Bien entendu, comme toute réponse biologique complexe, la voie de signalisation nucléaire et les voies de signalisation d'origine membranaire n'agissent pas de façon complètement indépendante l'une de l'autre. Par exemple, les voies MAPK et NFκB peuvent aussi être activées par des signaux d'origine nucléaire comme les kinases nucléaires ATM et ATR. Ces dernières pourraient aussi participer à l'activation des MAPK par les UV (Zhang et al., 2002).

### **5. Rôle de p53 dans la réponse UV et dans la régulation de la réparation par excision de nucléotides.**

Le gène TP53 est un gène suppresseur de tumeur dont la découverte remonte approximativement à 30 ans. En 1989, l'équipe de B. Vogelstein découvrit que des mutations dans le gène p53 étaient présentes dans un grand nombre de cancers et fut par la suite considéré comme un gène suppresseur de tumeurs. Les mutations de p53, conduisant à une perte de sa fonction, furent retrouvées dans approximativement 50 % des cancers humains (Hainaut et al., 1997; Hollstein et al., 1991). Ce gène semble capable d'inhiber, lorsqu'il est fonctionnel, la transformation cellulaire et la prolifération tumorales (Baker et al., 1990; Finlay et al., 1989). Il existe chez l'humain des pathologies et maladies héréditaires associées à une déficience de p53 comme le syndrome de Li-Fraumeni, qui est un syndrome rare héréditaire avec une très forte prédisposition au cancer (Olivier et al., 2003). En fait, p53 joue un rôle central dans la réponse adaptative et protectrice face aux dommages génotoxiques, aussi bien endogènes qu'exogènes. p53 est notamment induit par les stress oxydatifs et l'hypoxie (Levine, 1997; Sengupta and Harris, 2005). Ce suppresseur de tumeurs possède plusieurs modes d'action dans la réponse cellulaire aux UV. En effet, p53 peut agir essentiellement comme un facteur de transcription en agissant positivement ou négativement sur l'expression génique mais il pourrait agir aussi comme un facteur d'accessibilité à la chromatine pour favoriser la réparation de l'ADN. Plus précisément, p53 est une phosphoprotéine nucléaire dont l'affinité de liaison à l'ADN peut être régulée. D'ailleurs, cette

affinité augmente suite à une exposition aux UV ou aux IR (Lu and Lane, 1993; Rubbi and Milner, 2003). p53 semble exister majoritairement sous forme de tétramère en solution et en absence de stress génotoxique. La protéine p53 est en fait hautement stabilisée après UV, vraisemblablement par déstabilisation de son interaction avec Mdm2/Hdm2 (*Murine/Human double minute protein*). En effet, les niveaux protéiques de p53 dépendraient d'un équilibre entre la synthèse et la dégradation, placé sous le contrôle de Hdm2 (Melo and Eischen, 2012). De plus l'activité p53 peut aussi être contrôlée par un certains nombres de modifications post-traductionnelles de p53 comme la phosphorylation, la sumoylation, l'acétylation et la glycosylation (Xu, 2003). p53 serait, en fait, un nœud de communication et d'intégration des signaux de la réponse aux dommages à l'ADN (Sengupta and Harris, 2005; Smith and Kumar, 2010).

### 5.1 Régulation de la stabilité de p53 par Hdm2

En réponse aux UV, la dégradation de p53 par Hdm2 est inhibée, ce qui conduira à sa stabilisation rapide et à l'augmentation de ces niveaux protéiques endogènes. Hdm2 est un ubiquitine ligase qui maintient les niveaux cellulaires de p53 relativement bas. Cette déstabilisation est médiée par des modifications post-traductionnelles sur p53 mais aussi sur Hdm2. En effet, il a été montré qu'après une exposition aux UV, p53 peut être phosphorylée par les voies de signalisation de stress MAPK et les voies (ATM/ATR) (Bulavin et al., 1999; Buschmann et al., 2001; Huang et al., 1999; Kubbutat et al., 1997; She et al., 2000). Ces événements de phosphorylation, notamment ceux médiés par la voie MAPK JNK1/2 favoriseraient la stabilisation et la multimérisation de p53 de la même façon que les phosphorylations de Hdm2 (Topisirovic et al., 2009). Ces événements de phosphorylation, empêcheront Hdm2 de polyubiquitiner p53 et l'entraîner ainsi sa dégradation par le protéasome 26S (Yang et al., 2004). En plus de ces mécanismes de stabilisation, il existe aussi un mécanisme, de rétrocontrôle (ou *feedback*) puisque p53 est lui-même capable d'induire l'expression de Hdm2 et ainsi limiter sa propre action dans le temps (Lahav et al., 2004). Un autre homologue à Hdm2, Hdmx, peut aussi venir réguler l'activité de p53 en inhibant

l'activité transcriptionnelle de ce dernier (Jackson and Berberich, 2000; Little and Jochemsen, 2001; Wade et al., 2006).

### 5.2 Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire induits par les UV

Comme il fut mentionné avant, p53 participe activement au contrôle de la progression cellulaire dans la réponse UV. p53 est en effet capable d'entraîner un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et en phase G2 par différents mécanismes. L'arrêt en phase G1 implique comme déjà précisé, p21waf1, qui jouera un rôle central dans l'inhibition de l'activité des complexes cycline/CDK (Cycline D/Cdk4,6; Cycline E/Cdk2 et Cycline/Cdk2). Cette régulation via p21waf1 permettra de ralentir ou d'arrêter transitoirement le cycle cellulaire en agissant sur la transition G1/S (el-Deiry et al., 1993). p21waf1 pourrait également inhiber la réplication de l'ADN en phase S par interaction avec PCNA. Cependant cette interaction est encore sujette à controverses. En conclusion, la transition G1/S est contrôlée par la coopération entre les voies Rb-E2F, c-myc et l'axe p53-p21waf1 (Bartek and Lukas, 2001). p53 peut aussi réguler la transition G2/M, et donc être aussi essentiel pour la stabilité chromosomique, par inhibition de l'expression d'un certain nombre de gènes nécessaires à la transition G2/M (Stark and Taylor, 2006).

### 5.3 Rôle de p53 dans l'apoptose induite par les UV

p53 est un régulateur important de l'apoptose induite par les UV, et c'est probablement sa plus importante fonction dans son rôle de suppresseur de tumeur (Benchimol, 2001). p53 semble agir à la fois sur les voies apoptotiques d'origine mitochondriales (Puma, Bax, Apaf-1) mais aussi sur les voies de mort cellulaire (Jeffers et al., 2003; Vaseva and Moll, 2009). Son rôle de régulateur de l'apoptose s'effectue grâce à des mécanismes dépendants et indépendants de la transcription génique impliquée dans l'apoptose. Au niveau mitochondrial, p53 est rapidement transloqué dans la mitochondrie et entraîne une perméabilisation de la membrane externe de mitochondrie conduisant au relargage des enzymes de la machinerie apoptotique

des caspases et de dégradation de la chromatine. De plus, p53 induit l'expression de Puma, qui contrôlera la séquestration cytoplasmique de p53 par Bcl-xL, ce qui entrainera l'activation du facteur pro-apoptotique Bax. Il n'est pas encore bien établi si ce mécanisme de translocation mitochondrial de p53 peut se produire après une exposition aux UV. Il s'avère que les effets de p53 sur la réponse apoptotique pourraient combiner les activités de p53 cytoplasmiques avec celles de ses fonctions nucléaires. Le mécanisme exact de p53 sur l'apoptose et encore un mécanisme complexe dont la conséquence dépendra finalement de l'intégration d'un grand nombre de signaux cellulaires où Bcl-2 joue un rôle central dans cette réponse pro-apoptotique p53 dépendante (Knezevic et al., 2007).

#### 5.4 Rôle de p53 dans la régulation de la réparation GGNER des CPD et des 6-4PP

Etant donné la fonction suppresseur de tumeur, les cellules p53 déficientes pourraient présenter une inhabilité à être éliminées par apoptose, par exemple, et ainsi accumuler des mutations à l'ADN et des instabilités chromosomiques menant vers le développement du cancer comme cela est observé chez les patients affectés du syndrome Li-Fraumeni (LFS). En plus d'être un acteur important dans la réponse UV, p53 est peut également stimuler la réparation de l'ADN. Dans les années 1990, il a été montré que p53 était impliqué dans les mécanismes de recombinaison homologue et de réparation de l'ADN, entre autre par sa liaison à l'ADN simple brin (Bakalkin et al., 1995), au mésappariements de base (Lee et al., 1995) ou par interaction avec les facteurs de réparation (Wang et al., 1995). Ces observations démontrent d'une part que le rôle de p53 dans la réponse aux dommages à l'ADN ne se limite pas à son rôle de facteur de transcription, et d'autre part qu'il peut se recruter au site du dommage à l'ADN.

Il a été montré par l'équipe de P. Hanawalt que p53 est aussi nécessaire à l'élimination des CPD par le GGNER mais dispensable pour l'activité TCNER (Ford and Hanawalt, 1995; Smith et al., 1995). En plus de ces observations obtenues avec les cellules Li-Fraumeni, il a été montré qu'une déficience p53 induite par l'expression de l'oncoprotéine HPV-E6 (conduisant p53 vers la dégradation), mène à un défaut clair de réparation GGNER (Ford et al., 1998; Mathonnet et al., 2003). L'ensemble de ces observations indique de façon clair que la

déficience p53 entraîne un défaut de réparation de 25 à 50% des CPD par le GGNER, ce qui suggère que p53 est important pour l'activité GGNER, mais pas indispensable à cette réparation. Les effets de la déficience de p53 sur l'activité GGNER ne se limite pas seulement à l'élimination des CPD mais concerne aussi l'élimination des adduits comme ceux de benzo(a)pyrene (Lloyd and Hanawalt, 2002). Les mécanismes par lesquels p53 peut réguler le GGNER ont été en partie élucidés et suggèrent que p53 pourrait participer ou faciliter l'étape GGNER de reconnaissance du dommage. Il a été, en effet, rapporté que p53 peut réguler l'expression des gènes GGNER, DDB2 et XPC (Adimoolam and Ford, 2003; Hwang et al., 1999). Il semble donc que l'action de p53 sur l'activité GGNER réside essentiellement dans sa fonction de facteur de transcription en réponse aux UV. Néanmoins, l'induction transcriptionnelle de ces gènes est plus tardive que le recrutement de ces protéines aux CPD, ce qui suggère que d'autres fonctions sont impliquées. Il a été montré, d'une part, que p53 peut interagir avec les facteurs du NER, XPB et XPD et que cette interaction entrainera une inhibition de leur activité hélicase (Wang et al., 1995), et d'autre part que p53 pourrait faciliter le recrutement de XPC et de TFIIH au dommage (Wang et al., 2003b). Cette participation p53 dans cette reconnaissance directe du dommage reste encore à éclaircir. De plus, il est nécessaire de souligner aussi que la déficience de p53 ne semble pas avoir d'effets sur l'élimination des 6-4PP, cette caractéristique fait toutefois encore l'objet de discussions, même si de nombreuses études confirment cet effet (Adimoolam et al., 2001; Auclair et al., 2008; Ferguson and Oh, 2005). L'absence d'un rôle de p53 sur l'activité TCNER mérite cependant d'être revisitée en raison de résultats contradictoires dans la littérature. Cependant, il semble que la longueur d'onde UV incidente pourrait être la source de ces résultats parfois contraires (Mathonnet et al., 2003). L'altération de l'efficacité de réparation des CPD par le GGNER n'est peut-être pas un phénomène universel et pourrait dépendre du type cellulaire. Il fut montré que les kératinocytes, p53 déficients, présentent une réparation normale des CPD contrairement aux lignées fibroblastiques p53 déficiente (Oh and Yeh, 2005).

En conclusion, depuis qu'il est établi que p53 puisse participer à l'activité GGNER, il semble plausible que des mutations dans le gène TP53, inactivant la fonction p53, pourraient conduire à une augmentation des instabilités chromosomiques et de la mutagenèse simplement par une diminution de l'activité NER globale. Ces mécanismes restent cependant complexes

ou pourraient agir à plusieurs niveaux. La possibilité que p53 pourrait être un facteur d'accessibilité des facteurs GGNER à la chromatine et ainsi faciliter l'élimination des CPD doit être prise aussi en compte (Rubbi and Milner, 2003; Wang et al., 2003b) comme un mécanisme possible additionnel de modulation de cette efficacité. Il n'y a cependant aucune preuve directe que p53 se localise au dommage pour faciliter l'accessibilité des facteurs du NER, même si ce dernier serait nécessaire à la localisation de p300 au site de dommage (Rubbi and Milner, 2003).

### 5.5 Rôle des autres membres de la famille p53 dans la réponse UV : p63 et p73

Après l'identification de p53, d'autres protéines homologues à cette dernière furent découvertes, les protéines p63 et p73 (Kaghad et al., 1997; Yang et al., 1998a). Ces deux homologues peuvent se lier sur les sites de liaisons à l'ADN au niveau de régions régulatrices de la transcription et sont capables d'activer certains gènes cibles de p53 et d'induire des réponses cellulaires aux dommages p53-dépendantes comme l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. Ces protéines entrent ainsi en compétition avec p53 sur certains sites de liaisons à l'ADN (Yang et al., 2002). Mais, ces deux homologues semblent aussi avoir des fonctions biologiques différentes de p53. En effet, p63 et p73 auraient des fonctions spécifiques plus éloignées de la réponse au stress génotoxique. Par exemple, p73 serait principalement impliqué dans le développement du système nerveux alors que p63 contrôlerait la différenciation de certains tissus. p73 peut aussi être stabilisée par la présence de dommages et déclencher une réponse apoptotique (Blandino and Dobbstein, 2004). Il a été aussi rapporté que p63 et p73 pourraient réguler la transcription de gènes participant aux mécanismes de réparation des cassures DSB de l'ADN comme Mre11-RAD51 et BRCA2 (Lin et al., 2009). Il fut tout de même démontré que p63 seulement, et non p73 et p53, est nécessaire à l'activité GGNER dans des kératinocytes et régule l'expression des gènes DDB2 et XPC (Blandino and Dobbstein, 2004; Lin et al., 2009).

## **6 Les voies de signalisation MAPK**

### **6.1 L'Organisation des voies MAPK : signalisation relais entre la membrane plasmique et le noyau**

Les voies MAPK sont activées en réponse à un grand nombre de stimulus et consistent en des cascades de phosphorylation successives qui permettent le relais des signaux émanant de la membrane vers le noyau. Elles font partie des voies principales de transmission des signaux d'origine cellulaire et extracellulaire, dont l'activation permettra la régulation coordonnée de la survie, l'apoptose, la différenciation et la migration cellulaire. Les voies de signalisation MAPK sont très conservées et se retrouvent chez tous les eucaryotes, de la levure à des organismes multicellulaires plus complexes tel que l'humain (Widmann et al., 1999). Plusieurs cascades MAPK furent identifiées dans les cellules de mammifères et leur grande conservation indique que ces voies ont été adaptées pour répondre à un grand nombre de signaux extracellulaires au cours de l'évolution. Dans tous les cas, les voies MAPK intègrent les signaux cellulaires et extracellulaires par des événements de phosphorylations séquentiels et centraux nécessaires à cette transmission. La phosphorylation et l'activation des protéines ciblées par les MAPK leur permettent de réguler des processus nucléaires et aussi extranucléaires. Les kinases MAPK appartiennent à la famille des Ser/Thr kinases dans laquelle chaque voie MAPK se compose de 3 kinases principales, chacune représentée par plusieurs isoformes. La famille ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase*) comprend les isoformes ERK1/ERK2, ERK3/ERK4, ERK5 et ERK7/8, la famille JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) se compose des isoformes JNK1/2 et JNK3 alors que la famille p38 consiste en 4 isoformes p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$ . La superfamille MAPK peut être organisée en 6 sous voies ou cascades principales ERK1/2, JNK1/2/3, p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ , ERK5(BMK), ERK3/4 et ERK7/8 (Cargnello and Roux, 2011).

La caractéristique commune à chacune de ces sous voies MAPK, est leur structure modulaire organisée en 3 modules, incluant la MAPK elle-même. En fait chaque sous voie peut être composée de 3 à 5 modules, mais seulement les 3 modules MAPKKK, MAPKK et MAPK sont communs à toutes les sous voies MAPK. Les voies JNK1/2/3, ERK1/2 et p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  sont considérées comme les voies MAPK canoniques, alors que les voies ERK3/4, ERK5(BMK) et ERK7/8 sont considérées comme des MAPK atypiques (*MAPK-like*),

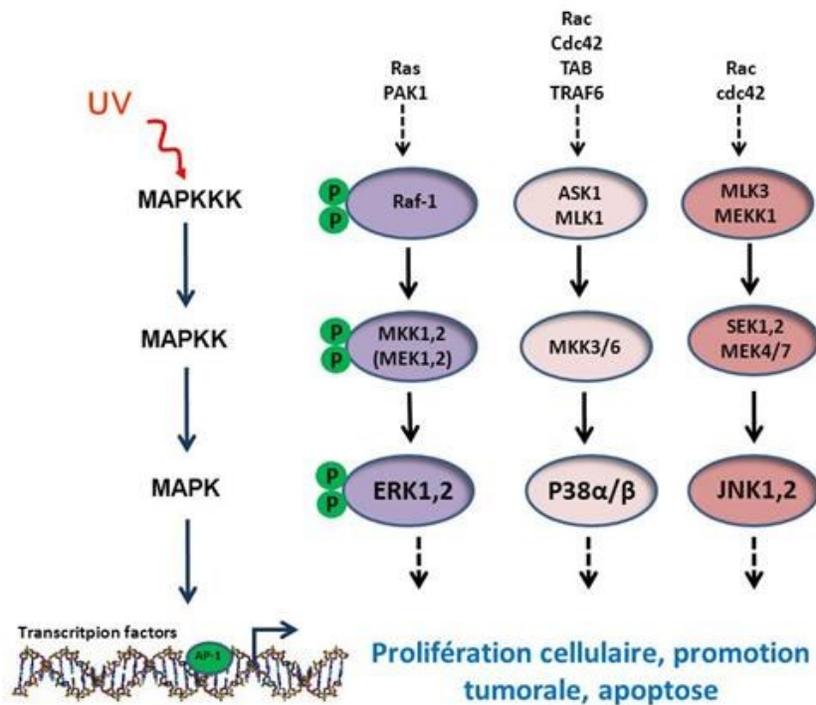
simplement, en raison de leur mécanisme d'activation qui diffère substantiellement de celui des MAPK canoniques (Cargnello and Roux, 2011).

### 6.1.1 Une organisation modulaire à 3 niveaux

Les modules MAPKKK, MAPKK et MAPK constituent la partie essentielle et centrale de la sous voie MAPK à laquelle ils appartiennent. Globalement, les voies MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*) sont phosphorylées sur leur thréonine et tyrosine par les MAPKK (*dual specificity kinase MAPK Kinase*) qui sont-elles mêmes phosphorylées par les MAPKKK (*serine/thréonine MAPK Kinase Kinase*) formant ainsi une cascade d'activation par phosphorylation ou cascade de signalisation (**Schéma 8**). Des kinases en amont (les kinases MAPKKK) et en aval des MAPK (comme les kinases MAPKAPK) existent dans certaines voies MAPK mais ne sont toutefois pas considérées comme parties intégrantes de la voie MAPK et ne sont pas toujours nécessaires à la signalisation de ces voies. Cependant, chaque module central peut se composer de différentes kinases résultantes souvent d'un épissage alternatif de certaines composantes. A ce jour, 12 MAPK, 7 MAPKK et 20 MAPKKK ont été identifiées dans les cellules de mammifères. Evidemment, le module MAPKKK est le module le plus diversifié et contrôle la spécificité d'activation à différents stimuli. Autrement dit, un grand nombre de MAPKKK active un nombre plus limité de MAPKK, qui conduit à l'activation spécifique de certaines voies MAPK. Les MAPKKK possèdent différents domaines régulateurs qui ne sont pas retrouvés chez les MAPKK et les MAPK, comme les domaines SH3 (*prolin rich sequence for binding SH*), PH (*Pleckstrin homology*) et de liaison à l'ATP. Ces 3 domaines peuvent être très diversifiés, ce qui permettra finalement une plus grande flexibilité et une plus grande adaptation dans la réponse à un grand nombre de stimulus d'origine extracellulaire. De plus, les trois modules MAPK peuvent être de plus différentiellement exprimés selon le type cellulaire ou l'origine du tissu (Raman et al., 2007). Il est important de souligner qu'un même module MAPKKK peut être impliqué dans plusieurs voies MAPK tels que les modules MEKK et MLK par exemple.

Il existe un certain nombre de mécanismes permettant d'assurer l'efficacité et la spécificité de la réponse UV évoquée par les MAPK. Ces mécanismes sont multiples et concernent les protéines d'échafaudage des cascades MAPK, les interactions avec le domaine

catalytique de la kinase ainsi que les interactions d'arrimage (*docking interaction*) entre les partenaires des voies MAPK. Ces interactions sont essentielles pour la spécificité et l'efficacité du signal relayé par les MAPK (Takekawa et al., 2005). Les domaines d'arrimage entre les MAPKKK et les MAPKK sont particulièrement importants pour la spécificité. Chez les mammifères, il existe différents domaines d'arrimage tels que les domaines variables DVD des MAPKK (permettant l'interaction avec les voies MAPKKK) et les domaines conservés CD (Biondi and Nebreda, 2003; Tanoue and Nishida, 2003). Les interactions d'arrimage forment ainsi un des mécanismes principaux de la reconnaissance du substrat par les membres des voies MAPK, mais il n'est pas le seul. L'intervention des protéines d'échafaudage (*scaffold protein*) ou adaptatrices permettra aussi d'augmenter la spécificité de la réponse MAPK.



**Schéma 8: Les voies MAPK, une organisation modulaire à trois niveaux.**

Chaque voie MAPK est constituée d'une cascade de phosphorylation successive conduisant à la modification de la signalisation cellulaire et des programmes transcriptionnels.

### 6.1.2 Les protéines d'échafaudage des voies MAPK

L'intensité, la spécificité et la durée de la signalisation MAPK sont entièrement contrôlées. Il semble que l'activation enzymatique d'une cascade MAPK ne soit pas suffisante pour une propagation efficace de la réponse évoquée en amont. Il se trouve que les cellules ont développées des protéines d'échafaudages qui permettront une régulation spatiale et temporelle de l'activité de ces cascades. Ces échafaudages moléculaires ou cargos moléculaires peuvent lier plusieurs membres d'une même cascade MAPK comme les MAPKKK, les MAPKK et les MAPK. Ces protéines d'échafaudages sont en générales dépourvues d'activité enzymatique et leur rôle consiste simplement à mettre les modules MAPK d'une cascade donnée en proximité spatiale dans le but d'augmenter et de favoriser l'efficacité et la spécificité de la cascade de phosphorylation MAPK. Ces cargos peuvent aussi réguler la localisation cellulaire ou le compartiment cellulaire d'origine du signal (Bandyopadhyay et al., 2010; Biondi and Nebreda, 2003). Ces protéines d'échafaudage furent en premier lieu identifiées dans la cascade ERK chez la levure (Elion, 2001) puis plus tard chez les mammifères (Roy et al., 2002; Roy and Therrien, 2002), et furent ensuite observées aussi pour les autres voies MAPK. Certaines de ces protéines sont spécifiques exclusivement à certaines voies MAPK alors que d'autres peuvent servir de module d'échafaudage dans plusieurs voies. Les représentants les plus connus de ces modules particuliers sont, chez les mammifères, le cargo JIP1 (Whitmarsh et al., 1998), KSR (Roy et al., 2002),  $\beta$ -arrestin (McDonald et al., 2000) et JLP (Lee et al., 2002). Par exemple, JLP peut former un complexe avec MKK4 et JNK1 (Lee et al., 2002) alors que JIP1 peut former un complexe avec MLK, MKK7 et JNK1 (Morrison and Davis, 2003). Ainsi la diversité, la compartimentation et la flexibilité de certaines protéines d'échafaudage participent à l'activation spécifique des MAPK ainsi qu'à la limitation temporelle de leur activité enzymatique (Dhanasekaran et al., 2007). Leur rôle rend l'intégration et la conséquence du signal évoqué plus complexe, et ceci dans le but de réguler finement leurs actions pléiotropiques.

Bien que les MAPK canoniques possèdent un identité de séquence de 40 % entre elles (Wilson et al., 1996), toutes ces kinases présentent une structure commune, similaire et sont schématiquement constituées de deux lobes globulaires, dont un petit lobe N-terminale (constitué de feuillets  $\beta$ ) et un lobe C-terminal (constitué d'hélices  $\alpha$ ) (Wang et al., 1997; Wilson et al., 1996). Le site catalytique se retrouve à l'interface entre ces deux lobes. L'activation des MAPK est enclenchée par la phosphorylation double sur les résidus thréonine et tyrosine hautement conservés et localisés dans le sous domaine VIII de la boucle d'activation (*activation loop* ou *T-loop*). Cette phosphorylation augmente la capacité d'induire des changements structuraux suffisants pour induire de 1000 fois l'activité kinase de ces dernières (Robbins et al., 1993). Cette boucle d'activation est, en fait, une extension flexible de lobe C-terminal, localisée à proximité du site actif dont le consensus est T-X-Y pour toutes les MAPK canoniques où T représente invariablement une thréonine et Y une tyrosine. Le résidu X peut varier selon les MAPK, et être représenté par un acide glutamique (E) pour ERK1/2, par une proline (P) pour JNK1/2 et une glycine (G) pour p38 $\alpha/\beta$  (Chen et al., 2001).

Les mécanismes moléculaires responsables de l'augmentation d'activité des voies MAPK sont communs à toutes les voies MAPK canoniques. Succinctement, la phosphorylation des motifs T-X-Y dans la boucle d'activation entraîne un remodelage de cette dernière ayant pour conséquence de moduler la conformation du site actif dans une conformation favorable à son activité enzymatique (Cobb and Goldsmith, 2000). Néanmoins, il existe certaines évidences indiquant que les voies MAPK peuvent être activées par réaction d'autophosphorylation et que ces dernières sont capables de former des homo-dimères. Ce type de mécanisme a été observé pour les trois voies MAPK canoniques ERK1/2, JNK1/2 et p38 $\alpha/\beta$ . Cependant ce type d'activation serait très minoritaire par rapport au mécanisme de phosphorylation double (Nitta et al., 2008).

Une fois la MAPK activée, celle-ci peut aller directement phosphoryler les motifs Ser/Thr-Pro [(S/T)P] de leurs cibles qui peuvent être présentes dans le noyau ou le cytoplasme. Parmi ces cibles, on retrouve également des kinases telles que RSK, MNK (*MAPK-interacting Kinase*), MAPKAPK (*MAPK-activated Protein Kinase*) et les kinases MSK (*Mitogen and Stress activated protein Kinase*).

### 6.1.3 Le contrôle de l'activité des voies MAPK

L'activité des voies MAPK est, bien entendu, transitoire et possède une limitation dans le temps. La durée, l'amplitude de l'activation de ces voies MAPK sont cruciales pour déterminer la réponse cellulaire. Globalement, les cascades MAPK sont dynamiquement régulées par phosphorylations et interactions protéine-protéine avec un haut degré de flexibilité. Toujours du point de vue dynamique, les cascades MAPK pourraient être vues comme un complexe multiprotéique soumis à son cycle d'association et dissociation qui pourrait être fortement stabilisé par de faibles modifications telles que la phosphorylation mais aussi par d'autres mécanismes. L'un des mécanismes principaux permettant le contrôle de l'activité des modules MAPK est la déphosphorylation. En effet, le retrait du groupement phosphate des résidus thréonines et tyrosines, assuré par les tyrosine-phosphatases et les Serine/Thréonine phosphatases, les phosphatases MKP et les Ser/Thr/Tyr phosphatases ou DUSP (*Dual Specificity Phosphatase*). Cette dernière sous classe de phosphatases regroupe un nombre important de protéines phosphatases dont l'implication dans la régulation des voies MAPK reste à démontrer pour un grand nombre d'entre elles. On retrouve ainsi des phosphatases MKP tyrosine spécifiques telles que HePtp, PTP-SL, et des MKP Ser/Thr spécifiques comme PP2A, PP2C (Kondoh and Nishida, 2007). L'inactivation des MAPK par les MKP consiste en une réaction catalytique en 2 étapes. Les MKP ont des profils d'expression et de spécificité différents selon les cascades MAPK. En effet, la liaison directe d'une MKP sur une MAPK entraîne une activation de l'activité phosphatase par un mécanisme où l'activation enzymatique est induite par le substrat, grâce à un réarrangement allostérique. Certaines MKP ont une expression induite et contrôlée par la cascade MAPK dans laquelle elles interviennent, ce qui permet une sorte de mécanisme de rétrocontrôle négatif. En raison du rôle fondamental des MAPK dans la régulation de processus biologiques majeurs, leur activité doit être finement régulée. Par exemple, la durée de l'activité ERK est déterminante pour la survie cellulaire (Marshall, 1995). La régulation spatiotemporelle de l'activité des cascades MAPK est donc très complexe, en raison de la multiplicité des mécanismes possibles et du nombre important d'intervenants, ayant une action non-exclusive et concomitante. De plus, les MKP peuvent être localisées spécifiquement dans certains

compartiments cellulaires comme MKP-1 qui démontre une expression presque exclusivement nucléaire alors que MKP-3 possède une localisation plutôt cytoplasmique.

Il existe un certain nombre de points de communication (*crosstalk*) entre les cascades MAPK, ce qui rajoute un niveau supplémentaire de complexité en réponse aux signaux de stress. Ces points de communications peuvent se situer à différents niveaux bien que les MAPKKK présentent le nombre le plus élevés de points de communication entre les cascades (Junttila et al., 2008). Les voies MAPK peuvent aussi phosphoryler les mêmes cibles en aval, tel que p53 et c-fos, pour moduler l'activité transcriptionnelle de ces facteurs. Quoiqu'il en soit, tous ces niveaux de régulation de leur activation rendent difficile toutes déductions sur la réponse exacte cellulaire qui pourrait être observée. Cependant, elles ne doivent pas être continuellement activées, et par conséquent, l'induction d'un mécanisme de rétrocontrôle est déterminant pour la rapidité et la durée de l'activation d'une voie MAPK donnée. Les mécanismes développés par les cellules pour contrôler étroitement ces activités MAPK forment finalement un ensemble coordonné agissant de façon spécifique ou non spécifique à une ou plusieurs voies MAPK pour réguler avec précision la réponse aux stress génotoxiques.

## 6.2 La cascade ERK1/2

La cascade ERK1/2 fut la première cascade MAPK identifiée et l'une des mieux caractérisées et comprises à ce jour (Ray and Sturgill, 1988; Sturgill et al., 1988). Au début, la transmission des signaux par la cascade ERK furent associés à la prolifération et la croissance cellulaire alors qu'aujourd'hui, il a été démontré que la voie ERK régule un très grand nombre de processus cellulaires. En effet, la cascade ERK1/2 est reconnue comme la voie de signalisation des signaux mitogènes et des agents de dommages à l'ADN. Les MAPK ERK1 et ERK2 présentent 80 % d'homologie de séquence entre elles et possèdent une expression ubiquitaire avec des niveaux plus élevés dans le tissu cardiaque, cérébral et dans le muscle squelettique (Boulton et al., 1991). Les kinases MEK1 et MEK2 (*MAPK/ERK kinase*), qui sont les MAPKK de la cascade ERK1/2, activent ERK1 et ERK2 par phosphorylation sur leur boucle d'activation au site T-E-Y. MEK1 et MEK2 et sont préalablement activées par c-Raf. Suite à cette activation, ERK1 et ERK2 vont se dissocier de leur protéine d'échafaudage pour

se transloquer transitoirement du cytoplasme vers le noyau pour activer les facteurs de transcription nécessaires aux programmes d'expressions géniques en réponse à un stimulus donné (Roux and Blenis, 2004). D'ailleurs, il semble que dans des cellules non stimulées, ERK1 et ERK2 sont retenues dans le cytoplasme par association avec des protéines d'ancrages comme les protéines du cytosquelette et les phosphatases. ERK1 et ERK2 se transloquent vraisemblablement dans le noyau par simple diffusion ou par transport actif (Adachi et al., 1999). Ces mécanismes restent toutefois encore mal caractérisés (Casar et al., 2008). En plus des MKP, RKIP (*Raf Kinase Inhibitory Protein*) est un régulateur important de cette voie et possède, en plus, la particularité de pouvoir se lier à chaque module de la cascade MAPK et ainsi empêcher certaines interactions entre les modules. RKIP pourrait aussi interagir avec d'autres kinases.

Pour résumer, la voie ERK1/2 est principalement activée par les récepteurs membranaires RTK, qui sont des récepteurs aux facteurs de croissance, et peut aussi être activée par les récepteurs couplés à la protéine G (GPCR). En fait, ERK1/2 peut être activée en amont par un grand nombre d'effecteurs et entraîner une grande variété de réponses, qui seront permises par le nombre important de gènes régulés par cette voie MAPK. D'ailleurs, ces gènes ont été dénombrés à plus de 150 (Yoon and Seger, 2006). ERK1/2 joue donc un rôle primordial dans les signaux des facteurs de croissance, et pourrait donc promouvoir la survie et la croissance sous les conditions basales mais aussi de stress cellulaire. Ces réponses de la voie ERK pour un même stimulus semblent toutefois dépendre de l'origine du tissu et des conditions imposées par l'environnement cellulaire.

### 6.3 La cascade JNK1/2

La cascade JNK1/2 fut originellement découverte en au début des années 1990 et fut identifiée comme la cascade SAPK (*Stress Activated protein Kinase*) simplement en raison de sa réponse à un grand nombre de stress environnementaux. JNK a été découverte par sa capacité à augmenter exclusivement l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription c-jun par phosphorylation (Derijard et al., 1994; Hibi et al., 1993). Les cascades JNK1 et JNK2 sont activées en réponse à une variété de stress cellulaires (comme le stress osmotique,

l'inhibition de la synthèse protéique, le choc thermique, les dommages à l'ADN, l'ischémie et enfin les UV) et se trouvent impliquées dans la régulation de l'apoptose, l'inflammation, la production de cytokines et aussi dans la neurodégénérescence. En comparaison avec la voie ERK1/2, la cascade JNK1/2 est plus complexe. Il existe à ce jour, au moins 10 isoformes JNK, résultantes d'épissages alternatifs à partir des gènes JNK1, JNK2 et JNK3. Ces isoformes sont variablement activées et exprimées dans les cellules. Ces gènes, aussi dénommés SAPK $\alpha$ , SAPK $\beta$  et SAPK $\gamma$  respectivement, sont aussi exprimés de façon ubiquitaire mais avec toutefois une exception. JNK3 est uniquement exprimée dans le cerveau. La cascade JNK1/2 est déclenchée par une variété d'activateurs extracellulaires, dont un grand nombre sont des agents de stress. Il semble que là aussi, les récepteurs aux cytokines et aux facteurs de croissances jouent un rôle important. Ces récepteurs membranaires situés à la surface cellulaire pourraient être activés de façon indépendante du ligand (voir section 7.1). L'activation de la cascade JNK1/2 est plus complexe que la cascade ERK1/2, d'une part en raison du plus grand nombre de MAPKKK (au moins 13) pouvant être activées par les RTK et/ou par les GTPases de la famille rho ( $\rho$ ). Ces MAPKKK sont représentées, entre autre, par ASK, MLK1-3, MEKK1 et MEKK4, qui peuvent elles-mêmes être activées par les MAPKKKK, représentées par PAK, GCK, TRAF et Shc (Kyriakis, 1999). Toujours de façon similaire à ERK1/2, l'activation des MAPK JNK1 et JNK2 est assurée par MKK4 et MKK7 (Davis, 2000) où MKK7 favorise plutôt la phosphorylation des thréonines alors que MKK4 favorise plutôt l'activation des tyrosines (Fleming et al., 2000). Une fois activées, elles aussi se transloqueront dans le noyau pour phosphoryler un certain nombre de facteurs de transcription dont c-jun, ATF-2, NFAT, HSF-1, Elk1. c-jun est peut être l'un des plus importants facteurs de transcription activés par la cascade JNK1/2. Cette exclusivité pour la voie JNK est en partie causée par ses spécificités structurales des sites de phosphorylation de ce dernier et résulte en une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'AP-1, comme mentionné avant. Ce facteur AP-1, une fois activé, régulera un nombre important de gènes impliqués dans la survie, l'apoptose et la réponse aux stress cellulaires (Davis, 2000). Cependant, là aussi, cette exclusivité de c-jun pour la voie JNK n'est plus tellement vraie car, dans certaines conditions, celui-ci peut aussi être phosphorylé par les MAPK ERK1 et ERK2 (Morton et al., 2003), de la même façon que c-Fos et Elk-1.

La cascade JNK possède aussi sa protéine cargo qui lui est spécifique comme JIP1, qui de plus possède une certaines affinités avec les facteurs de transcription c-jun et ATF rendant ainsi la cascade JNK1/2 beaucoup plus efficace. Plus exactement, on distingue aujourd'hui, 5 protéines d'assemblage ou cargos des cascades JNK1 et JNK2, nommées JIP1, JIP2, JIP3, JLP et POSH (Engstrom et al., 2010). Les protéines JIP peuvent être à la fois des activateurs et des inhibiteurs de la cascade JNK1/2. Cette multiplicité des protéines d'assemblages ne fait qu'augmenter encore la complexité de la régulation. Finalement, la fonction probable de ces protéines d'échafaudages est de concentrer les modules MAPK dans un espace restreint permettant une signalisation beaucoup plus efficace. De plus JIP2 et JIP3 pourraient aussi intervenir dans les cascades p38 $\alpha/\beta$  et ERK1/2. Les protéines JIP sont essentielles à la régulation spatio-temporelle de la cascade JNK1/2 notamment au cours du développement puisque leur ablation chez la souris entraîne une mortalité embryonnaire sévère (Yang et al., 1998b). Bien entendu, il existe aussi un certain nombre de points de communication de la voie JNK1/2 avec les voies ERK1/2 et p38 $\alpha/\beta$  ainsi que Akt (Dickens et al., 1997).

#### 6.4 La cascade p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$

De la même façon que les autres voies MAPK, la cascade p38-MAPK est aussi une voie de signalisation de stress, elle aussi activée par un grand nombre de stimulus. Globalement, la cascade p38-MAPK est activée par les cytokines et leurs récepteurs. La voie p38 est notamment impliquée dans la différenciation cellulaire, l'inflammation et dans la réponse aux stress environnementaux. Brièvement, la cascade p38-MAPK est représentée par 4 MAPK p38 nommées, p38 $\alpha$  (MAPK14), p38 $\beta$  (MAPK11), p38 $\gamma$  (MAPK12, ERK6), p38 $\delta$  (MAPK13, ERK4), qui ont également des variants. En fait la voie p38-MAPK peut être divisée en deux sous-groupes, l'un comprenant p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  et l'autre comprenant p38 $\gamma$  et p38 $\delta$  selon leur identité de séquence.

Les cascades p38-MAPK peuvent être activées tout comme les cascades JNK1/2 par un certain nombre de MAPKKK comprenant entre autre ASK1, MLK, TAK1 et aussi certaines kinases MEKK. La plupart de ces MAPKKK sont aussi capables d'activer la cascade JNK1/2. L'implication de ces MAPKKK dépend essentiellement du stimulus et du type cellulaire étudié (Cuevas et al., 2007). Une fois activées, par le stress ou les cytokines, les

MAPKKK vont aller activer à leur tour les MAPKK. Tout comme les autres voies MAPK, p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  sont activées *in vitro* comme *in vivo* par un certain nombre de MAPKK dont trois principales, MEKK3/MEKK6 et MEKK4/MEKK3 et MKK6 sont hautement spécifiques de la cascade p38-MAPK et n'exercent aucun effet sur les cascades ERK1/2 et JNK1/2 (Raingeaud et al., 1996). De plus, MKK6 peut phosphoryler toutes les isoformes de la cascade p38-MAPK alors que MKK3 agit seulement sur p38 $\alpha$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$ . Ces dernières, tout comme les autres MAPK seront activées par phosphorylation sur leur motif T-G-Y, pour ensuite aller phosphoryler un certain nombre de cibles, en aval, après leur translocation au noyau. Cependant p38-MAPK pourrait aussi s'activer par autophosphorylation de façon MKK indépendante (Diskin et al., 2007).

La voie p38 $\alpha/\beta$  possède contrairement à JNK1/2 un petit nombre de protéines d'échafaudage telles que JIP1 et JIP4, seulement. Les MAPK p38 ont des cibles nucléaires mais aussi cytoplasmiques. La MAPK p38 activée peut s'accumuler dans le noyau et aussi dans le cytoplasme. Cette localisation dépendrait du stimulus ou de l'origine du stress (Roux and Blenis, 2004). Les voies p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  phosphorylent un ensemble de cibles comprenant des protéines kinases, des facteurs métaboliques, de facteurs de la traduction et des protéines du cytosquelette.

Les voie p38-MAPK ont la particularité de phosphoryler une classe particulière de kinases en aval du module MAPK, qui leur sont spécifiques, les protéines kinases MK (MAPKAPK). Les substrats de cette famille comprennent en outre, des régulateurs du cycle cellulaire, de l'apoptose et des facteurs de transcription. Les fonctions des kinases MK sont multiples et concernent la migration cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, le remodelage de la chromatine, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose. Il y a 3 MK impliquées dans la cascade p38-MAPK, dont MK2 (MAPKAPK2), MK3 (MAPKAPK3) et MK5 (MAPKAPK5). Ces kinases se localisent dans le cytoplasme et aussi dans le noyau, dont l'activation modifiera leur localisation subcellulaire. En effet, leur activation semble couplée à leur exportation nucléaire. Par exemple, MK2 et MK3 semblent activées que par la voie p38 $\alpha/\beta$  et non par les voies p38 $\gamma$  et p38 $\delta$  bien qu'il ait été aussi rapporté que ces kinases MK peuvent être activée ERK1/2 et JNK1/2 (Gaestel, 2006). Ces événements semblent toutefois très rares. MK5, en revanche, ne semble activé uniquement que par la cascade ERK3. Dans le noyau, les kinases p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  vont phosphoryler un certain nombre de facteurs de transcription représentés

notamment par p53, ATF2, CHOP, STAT1 et MEF2 (Roux and Blenis, 2004), qui peuvent eux aussi être phosphorylés par les autres voies MAPK. La durée d'activation des voies p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$  sont régulées par des phosphatases non exclusives à cette voie comme MKP7, PP2C, PTP.

Toutes les cascades MAPK ont leur importance et forment une signalisation centrale pour l'adaptation cellulaire aux changements environnementaux. Leur régulation doit être intimement contrôlée pour éviter tous dérèglements qui pourraient conduire à des situations pathologiques comme l'apparition du cancer, des malformations développementales et des maladies cardiovasculaires. Regardons plus en détails les rôles spécifiques de ces voies MAPK dans une situation beaucoup plus banale et fréquente telle qu'une exposition au soleil.

## **7 Activation et rôles des voies de signalisation MAPK dans la réponse aux UV**

### **7.1 Activation des cascades MAPK par les UV dans les cellules de mammifères**

Très tôt, les cascades MAPK ont montré leur capacité à être activée par les UV, puisque cette propriété fut à l'origine même de leur identification (Hibi et al., 1993; Minden et al., 1994). En raison des différences de longueur d'ondes UV utilisées (UVA, UVB ou UVC), les voies MAPK peuvent présenter différents mécanismes et origines d'activation. Par exemple les UVA vont induire un plus grand nombre de ROS et de dommages oxydatifs que les UVC. En effet, il s'avère que les MAPK peuvent être activées différemment en fonction de l'énergie UV incidente (Kabuyama et al., 2001), et selon le type cellulaire étudié (Bode and Dong, 2003; Bomser, 2002). Bien qu'il existe beaucoup de résultats contradictoires dans la littérature, un grand nombre d'études rapportent toutefois une activation concomitante des trois voies MAPK JNK1/2, ERK1/2, p38 $\alpha$ / $\beta$  par exposition aux UV, qu'il s'agisse d'UVA, d'UVB ou bien d'UVC. Cependant l'origine de leur activation reste encore mal comprise et ne résulterait pas d'un mécanisme unique mais de la convergence de plusieurs mécanismes ou événements moléculaires. De plus, l'induction des voies MAPK pourrait dépendre aussi de l'activation des voies de signalisation nucléaires. Même si la réponse cellulaire aux UV est

induite par la convergence de signaux cytoplasmiques est nucléaires, dépendants ou non de la présence de dommages, il semble toutefois que les MAPK soient aussi activées par des mécanismes indépendants de la présence du dommage. Il reste difficile d'exclure toutes participations de la présence du dommage à l'ADN dans cette réponse, qui resterait cependant très minoritaire (Adler et al., 1995). De plus, il a déjà été rapporté que la cascade JNK peut être activée en absence de dommages à l'ADN dans des cellules HeLa énuclées et dans d'autres types cellulaires (Roduit and Schorderet, 2008; Song and Lee, 2007). Il a aussi été montré, très tôt, que l'activation des kinases *Ras* et *src* par les UV, qui sont localisées à proximité de la membrane plasmique, sont capables d'activer la cascade ERK1/2 et c-jun (Devary et al., 1993; Devary et al., 1992) et que cette activation est un événement précoce (Devary et al., 1993; Sachsenmaier et al., 1994b). Les MAPK seraient donc plutôt activées par des mécanismes émanant de la membrane plasmiques et par certains récepteurs membranaires (Rosette and Karin, 1996), ce qui renforce le rôle de relais, des voies MAPK, des signaux de la membrane vers le noyau.

Modèle d'activation des MAPK par les UV : P. Rosette et M. Karin ont proposé, très tôt, que l'activation des récepteurs des facteurs de croissances par les UV pouvait être l'étape initiale de la réponse UV indépendant du noyau ou de l'induction de dommages à l'ADN (Devary et al., 1993; Rosette and Karin, 1996). Dans ce modèle, l'activation des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) semble se produire indépendamment de la fixation de ligand (Derheimer et al., 2007; Knebel et al., 1996). Une augmentation de l'activité EGFR de façon indépendante de la présence du ligand fut, en effet, rapportée dans plusieurs systèmes cellulaires après une exposition aux UV et que cette activation corrèle l'activité de la cascade ERK1/2 induite (El-Abaseri et al., 2005; Huang et al., 1996; Sachsenmaier et al., 1994b). L'un des mécanismes retenus dans ce phénomène se caractérise par une autophosphorylation des RTK accompagnée par une inhibition des protéines phosphatases, qui régulent l'activité RTK, et aussi des phosphatases MAPK (MKP) (Knebel et al., 1996). L'activation des RTK serait générée par perturbation de la structure physique de la membrane, provoquée par l'absorption de l'énergie UV par les lipides membranaires. Cet effet inhibiteur des UV serait entre autre généré par des dommages oxydatifs cytoplasmiques et par les ROS générées au niveau de la membrane (Knebel et al., 1996). Ici, aussi, il peut exister des contradictions. Il a aussi été rapporté que

dans les mêmes lignées cellulaires, aucune activation EGFR n'a pu être détectée alors que les kinases MEK1/2 et ERK1/2 sont activées (Oksvold et al., 2002). Même si les mécanismes d'activation RTK sont encore mal compris, le modèle précédent reste d'actualité, et à tout de même été confirmé depuis (Iordanov et al., 2002). Même si aucun récepteur n'a été encore formellement identifié comme l'initiateur principal de la signalisation MAPK induite par les UV, d'autres classes de récepteurs autres que les RTK peuvent participer à cette activation. En effet, les récepteurs aux hydrocarbures polycycliques (AhR) semblent participer à l'activation de la voie ERK1/2 (Fritsche et al., 2007). Plus précisément, les photoproduits du tryptophane seraient de bons ligands pour ce récepteur nucléaire, qui une fois transloqué dans le noyau, provoque l'internalisation de EGFR et l'activation subséquente de la voie ERK1/2 (Fritsche et al., 2007). De plus, il a été rapporté que EGFR semble capable de se transloquer au noyau après une exposition aux UV pour moduler l'expression de certains gènes (Xu et al., 2009). Ce phénomène de translocation d'un récepteurs membranaire vers le noyau est relativement nouveau et de fonction physiologique encore inconnue. De plus, cet évènement a aussi été observé pour FGFR (Reilly and Maher, 2001). Bien évidemment, EGFR n'est pas non plus le seul récepteur RTK auto-activé par les UV, il y a aussi le récepteur FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*), le récepteur InR (*Insulin Receptor*) et le récepteur PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*). Les mécanismes d'activation pour les autres voies MAPK JNK1/2 et p38 $\alpha/\beta$  sont bien moins connus probablement en raison de la plus grande complexité MAPKKK et des origines plus nombreuses de leur activation. Néanmoins, pour ces 2 voies MAPK, en aval des RTK, certaines MAPKKK, intervenant dans ces deux voies, furent activées par les UV. Tel est le cas pour MKK3, MKK6 et MKK1 qui seraient, de plus, essentielles à l'activation *in vivo* de p38-MAPK par les UV (Reilly and Maher, 2001). Plus en amont des MAPKKK, il y a aussi Rac et CDC42 qui sont également activées par les UV (Xia et al., 2000). Il y a aussi la voie EGFR/Grb2/MEKK1/SEK1/JNK1 (Xia et al., 2000), qui indique que JNK1 peut être aussi induite par les RTK et que ce mécanisme n'est finalement pas exclusif à la voie ERK1/2 car il y aurait possiblement la voie c-Met/Gab1/JNK1 ou c-Met/Gab1/ ERK1/2.

En conclusion, l'activation des MAPK par les UV reste encore aujourd'hui un phénomène complexe. La multiplicité des modes possibles d'activation, l'absence d'un senseur UV unique ainsi que l'absence d'expression de programmes transcriptionnels définis

et spécifiques aux UV, font que les phénotypes cellulaires résultant de cette réponse UV, médiés par les MAPK, sont hétérogènes, difficiles à prévoir et probablement dépendants de d'autres voies de signalisation cellulaires. En raison des données divergentes dans la littérature, les modes d'activation MAPK ainsi que leur activation elle-même dépendront essentiellement du type cellulaire étudié et de la longueur d'onde UV incidente.

## 7.2 Rôles et fonctions apoptotiques des cascades MAPK activées par les UV

L'activation normale des voies MAPK par les UV semble avoir un rôle plutôt protecteur à l'échelle de l'organisme face à l'induction de dommages protéiques, lipidiques et à l'ADN provoquée par les UV. Par exemple, lorsque les dommages de tous genres sont trop élevés pour la vie cellulaire post UV, les voies MAPK avec d'autres voies coopéreront pour promouvoir plutôt l'apoptose que la survie cellulaire, dans ce contexte précis. L'apoptose est un processus cellulaire primordial pour le développement d'organismes multicellulaire pour éliminer les cellules endommagées suite à une exposition à des génotoxiques endogènes comme exogènes. Ce processus, quand il est induit par les UV, fait intervenir les récepteurs de surface cellulaire, les ROS et les dommages à l'ADN (Vetta et al., 2009). Ceux-ci conduiront ensembles à l'activation des caspases et protéases exécutrices de l'apoptose. La contribution des ROS dans l'apoptose induite par les UV est toutefois encore sujette à débat même s'il semble que les CPD soient les principaux déclencheurs de l'apoptose dans les cellules normales et que ce soit les 6-4PP, les déclencheurs dans les cellules NER-déficientes (Lo et al., 2005). Plus exactement, il y a deux voies de signalisation pour activer les caspases post-UV. Il y a la voie extrinsèque qui est initiée par les récepteurs de mort cellulaire à la surface et implique la caspase 8, et il y a la voie intrinsèque, ou mitochondriale, qui se compose de facteurs régulant les activités anti- ou pro-apoptotiques et qui nécessite la caspase 9. La voie intrinsèque semble la plus sensible pour la détection des signaux pro-apoptotiques (Kulms et al., 1999). Le rôle exact de chacune de ces voies, intrinsèques et extrinsèques dans l'apoptose induite par les UV reste mal défini et leur contribution respective est encore controversée. Cependant les UV semblent capables d'activer les récepteurs de mort cellulaire au niveau de la

membrane TNRF1, CD95/APO-1 en induisant leur regroupement membranaire et une augmentation de leur expression (Rosette and Karin, 1996).

En dépit de l'activation des trois voies MAPK canoniques par les UV, la voie JNK1/2 fut pendant longtemps considérée comme un acteur essentiel à l'apoptose induite par les UV et les IR (Rosette and Karin, 1996; Xia et al., 1995). Il est généralement accepté que les voies JNK1/2 et p38 $\alpha/\beta$  sont importantes pour la signalisation de stress conduisant à la mort cellulaire alors que la voie ERK1/2 participe plutôt à la signalisation cellulaire de survie et de croissance cellulaire (Xia et al., 1995). En effet, un grand nombre d'études montrent un effet plutôt pro-apoptotique pour la voie JNK1/2 (Davis, 2000; Liu and Lin, 2005). D'ailleurs les souris déficientes *Jnk1* et *Jnk2* montrent une diminution de l'apoptose induite par les UV et que la phosphorylation de c-jun soit nécessaire à ce processus (Tournier et al., 2000). La voie JNK1/2 induit l'apoptose majoritairement par le mécanisme intrinsèque par stimulation du relargage du cytochrome-c par la mitochondrie (Lei and Davis, 2003). Aujourd'hui, il semble que la voie JNK1/2 soit plutôt une voie modulatrice de l'apoptose plutôt qu'une actrice directe de l'exécution de ce processus funèbre (Lin, 2003). La voie JNK1/2 n'est toutefois pas non plus une voie pro-apoptotique universelle, son activité peut aussi être anti-apoptotique. En effet, un nombre croissant d'études indiquent que cette voie est aussi douée d'activités anti-apoptotiques et de survie (Lamb et al., 2003). Les mécanismes de cette activité anti-apoptotique font encore l'objet d'études, mais cette fonction serait dépendante de p53. Plus exactement l'arrêt du cycle cellulaire induite par p53 post-UV pourrait être inhibé par l'activation de la voie JNK1/2 (Shaulian and Karin, 2002). Les modifications post-traductionnelles de p53 par la voie JNK1/2 pourraient aussi moduler la réponse anti-ou pro apoptotique de cette dernière par déstabilisation de p53 (Fuchs et al., 1998; Potapova et al., 2000b). Globalement, la fonction précise de la cascade JNK1/2 dans l'apoptose induite par les UV est relativement complexe et finalement difficile à prédire. Le destin spécifique d'une cellule exposée aux UV, ainsi que ses conséquences biologiques à cette échelle, dépendront de la dose UV appliquée, du type cellulaire, des autres voies MAPK et bien entendu de la durée des signaux MAPK. D'ailleurs il a été suggéré que la durée d'activation JNK1/2 serait déterminante pour la survie ou la mort cellulaire induite par les UV. Une activation courte mènerait plutôt vers la survie et une activation longue mènerait vers l'apoptose (Lamb et al.,

2003; Ventura et al., 2006). Cette vision toutefois simpliste fait abstraction complète de la contribution des autres voies MAPK à ce phénomène (Xia et al., 1995). En effet, les cascades JNK1/2 et ERK1/2 semblent exercer leur action par un équilibre dynamique dont l'action pro-apoptotique de JNK est inhibée par l'action de survie de la voie ERK1/2 (Herrlich et al., 2008; Xia et al., 1995). Bcl-2 jouerait un rôle pivot dans la réponse apoptotique post-UV dépendante de la voie p53-E2F. Pour complexifier encore plus cette réponse apoptotique, la cascade p38 $\alpha$ / $\beta$  peut venir aussi influencer cette réponse (Hildesheim et al., 2004; Porras et al., 2004).

Tout comme la voie JNK1/2, la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  peut posséder des fonctions pro-apoptotiques (Hildesheim et al., 2004; Porras et al., 2004) et anti-apoptotiques (Gong et al., 2010; Park et al., 2002b). Cette voie agirait en modulant un certain nombre de facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques et utiliserait le mécanisme intrinsèque (Kim et al., 2006). La prédiction de la fonction pro-apoptotique ou anti-apoptotique de p38 $\alpha$ / $\beta$  après exposition UV sera, ici aussi, difficile à déterminer mais pourrait faire intervenir MK2 et p53 (Nakagawa et al., 2004; Reinhardt et al., 2007). En fait, p38 $\alpha$  pourrait même être considérée comme un suppresseur de tumeur, mais cette question est encore en débat (Manke et al., 2005; Nemoto et al., 1998). De plus, la modulation de la tumorigénèse par p38 $\alpha$  serait indépendante de son rôle dans l'inflammation (Hui et al., 2007b). p38-MAPK pourrait aussi être un senseur du stress oxydatifs. Dans le contexte de la réponse UV, les effets protecteurs de p38-MAPK et de p53 pourraient aussi résulter de leur action sur les points de contrôles du cycle cellulaire.

Enfin, il existe cependant, peu d'évidences suggérant une implication directe de la voie ERK1/2 dans l'apoptose induite par les UV. Cette voie semble plutôt exercer son activité pour la promotion de la survie cellulaire.

### 7.3 Régulation de la progression cellulaire

La maintenance de l'intégrité cellulaire et génomique est essentielle à la survie, d'où la nécessité d'exercer un contrôle étroit de la progression cellulaire dans les différentes phases du cycle cellulaire. Cette modulation ne peut s'effectuer que grâce à l'existence de points de contrôle du cycle cellulaire, comme les points de contrôle (*ckeckpoint*) G1/S, S et G2/M.

Depuis un certain temps, il est établi que les voies MAPK exercent un contrôle sur la progression des cellules dans les phases du cycle cellulaire. D'ailleurs les voies MAPK pourraient avoir des fonctions précises selon la phase du cycle cellulaire (Bulavin et al., 2001; Roovers and Assoian, 2000). De façon extrêmement simplifiée, ces points de contrôle exerceront leur activité majoritairement grâce aux effecteurs Chk1, Chk2 et MK2 (Donzelli and Draetta, 2003). Les voies JNK1/2, ERK1/2 et p38 $\alpha$ / $\beta$  peuvent en effet participer à la progression du cycle cellulaire par phosphorylation et stabilisation du régulateur p21waf1 comme déjà mentionné (MacCorkle and Tan, 2005; Patel et al., 1998; Potapova et al., 2000a). Plus précisément, la voie JNK1/2 régule la progression basale du cycle cellulaire dont les transitions G1/S et intra-S en absence de stress, cette voie régule aussi la transition mitotique (G2/M) (Blandino and Dobbstein, 2004; Mingo-Sion et al., 2004). Ces effets de l'activation JNK1/2 sur la progression du cycle cellulaire ne sont pas universels. Ici aussi, ils pourraient plutôt refléter des différences dans les isoformes de la cascade JNK.

La cascade ERK1/2 fut caractérisée d'essentielle pour la ré-entrée dans le cycle cellulaire en réponse aux signaux génotoxiques. L'activation de la cascade ERK1/2 conduira, en effet, à un arrêt G1 mais aussi à une augmentation de la progression G1/S (Ussar and Voss, 2004). Pour expliquer ces différences de réponse, il semble que l'activation transitoire de la voie ERK1/2 stimule la progression du cycle cellulaire alors que l'activation prolongée stimulerait l'arrêt du cycle cellulaire (Roovers and Assoian, 2000). De plus, il existe une forte corrélation entre l'activité ERK1/2 et la progression dans les phases du cycle cellulaire. L'inhibition d'un seul des acteurs de cette voie comme Raf-1, MEK1, MEK2, ERK1 ou ERK2 conduit une diminution drastique de la viabilité cellulaire et de la prolifération (Liu et al., 2004). L'inhibition concomitante de MEK1 et MEK2 entraîne un arrêt du cycle en G1 alors que l'inhibition seule de MEK1, conduit à un arrêt en G2. Des résultats inverses ont aussi été montrés (Ussar and Voss, 2004). Néanmoins, l'activité de la voie ERK1/2 semble nécessaire pour la progression cellulaire et peut moduler la progression des cellules dans les phases G1, S, G2/M.

Tout comme les autres cascades, la cascade p38 $\alpha$ / $\beta$  est aussi impliquée dans la régulation de la progression cellulaire, et module plus particulièrement la transition G1/S et G2/M via MK2 (Bulavin et al., 2001; Manke et al., 2005). Cette cascade MAPK peut contrôler la transition G1/S par phosphorylation de p53 et de p21waf1 par exemple (Kim et al., 2002).

MK2 joue cependant un rôle important de ce contrôle de la progression cellulaire exercée par la voie p38 $\alpha$ / $\beta$ . En effet, MK2 semble spécifiquement participer au maintien des points de contrôles G1/S et G2/M en réponse aux UV (Thornton and Rincon, 2009). La participation de la cascade p38 $\alpha$ / $\beta$  dans le contrôle de la progression S et G2/M implique deux mécanismes p53-dépendants par inhibition de CDC25B (Bulavin et al., 1999) ou via l'activation de MK2 par p38 $\alpha$ / $\beta$  (Manke et al., 2005). Ces mécanismes de contrôles seraient aussi dépendants toutefois du type cellulaire étudié (Takenaka et al., 1998). En raison des rôles de p38 $\alpha$ / $\beta$  sur l'apoptose et la progression du cycle cellulaire, il a été proposé une fonction de suppresseur de tumeur tel que mentionné précédemment. La voie p38 $\alpha$ / $\beta$  contrôlerait donc la progression G1/S et G2/M suite à l'induction de dommages, principalement dans le but de laisser le temps à la cellule d'intégrer les différentes voies de signalisation et aussi de laisser le temps aux systèmes de réparation à l'ADN de s'exécuter. Cette fonction suppresseur de tumeur potentielle pourrait aussi s'appliquer à la voie JNK1/2. Beaucoup plus d'études sont encore nécessaires mais il se pourrait que dans quelques années, les voies MAPK soient considérées comme des voies suppressives de tumeurs, se révélant seulement dans des conditions particulières.

En dépit du rôle des voies MAPK dans la réponse UV, leur rôle sur la réparation de l'ADN reste beaucoup moins bien documenté. En plus de réguler la réponse UV et en particulier la progression cellulaire pour favoriser une réponse des plus adaptées, l'activation des voies MAPK pourraient aussi bien stimuler l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN, en plus de la régulation des transitions des phases du cycle cellulaire. Leur activation globale pourrait donc être protectrice et ainsi démontrer leur rôle de relais du cytoplasme vers le noyau pour réguler les événements d'élimination des dommages à l'ADN, qui sont purement nucléaires. L'existence d'une telle stimulation d'origine cytoplasmique permettrait, sans aucun doute, à la cellule de s'adapter le plus rapidement possible aux changements d'environnements extracellulaires. L'étude de ce lien potentiel fera l'objet de la première partie de cette thèse.

**A sensitive flow cytometry-based nucleotide excision repair assay unexpectedly reveals that mitogen-activated protein kinase signaling does not regulate the removal of UV-induced DNA damage in human cells (Article 1)**

## **Article 1: Liste des co-auteurs**

Yannick Auclair

El Bachir Affar

Martin Loignon

Elliot Drobetsky

**Rouget Raphael, Auclair Yannick, Loignon Martin, Affar el Bachir. and Drobetsky Elliot.A.** (2008). A sensitive flow cytometry-based nucleotide excision repair assay unexpectedly reveals that mitogen-activated protein kinase signaling does not regulate the removal of UV-induced DNA damage in human cells. *J Biol Chem*, 283, 5533-41.

### **Article présenté en Annexe pour consultation**

**Contributions :** Tout les travaux présentés dans cet article ont été réalisés par Raphael Rouget, à l'exception de l'optimisation de la méthode de réparation NER qui a été développée et optimisée par le Dr. Yannick Auclair et Raphael Rouget. Le Dr. el Bachir Affar a su apporter une aide technique et un regard critique lors de la discussion des résultats. Le Dr Martin Loignon a fourni le vecteur codant l'ARNsh de p53. Le Dr. Elliot Drobetsky et Raphael Rouget ont élaboré, analysé les expériences et écrit l'article cité juste au dessus.

## **I. A sensitive flow cytometry-based nucleotide excision repair assay unexpectedly reveals that mitogen-activated protein kinase signaling does not regulate the removal of UV-induced DNA damage in human cells**

Globalement, la stratégie expérimentale, qui est proposée dans cette partie repose essentiellement sur une inhibition de l'activité MAPK induite par les UV. Cette stratégie devrait permettre de rendre compte de la participation de chaque voie MAPK dans la réparation des dommages induits par les UV. L'approche choisie, basée sur une inhibition pharmacologique et moléculaire, pour être concluante, doit utiliser une méthode d'analyse fiable, sensible et bien évidemment quantitative de la réparation des CPD et des 6-4PP par le NER. La méthode de réparation choisie doit aussi être réalisable dans des délais et de considérations de coûts raisonnables. Il existe un certain nombre de méthodes d'analyses quantitatives de la réparation des dommages induits par les UV, ayant chacune leur propre avantages et inconvénients en fonction de leur nature et de leurs principes techniques.

### **I.1 Les méthodes d'analyses quantitatives de la réparation des dommages à l'ADN par excision de nucléotides**

Au cours de ces 5 dernières décennies, des méthodes d'analyse NER ont été développées et optimisées afin de détecter les dommages à l'ADN réparés par le système NER dans divers organismes. Seulement un petit nombre de méthodes permettent une étude quantitative et ainsi d'établir une cinétique de la réparation des CPD et des 6-4PP. Bien que ces méthodes aient des principes différents, toutes peuvent refléter directement ou indirectement l'activité du NER. Dans ce paragraphe, seules les techniques les plus utilisées et reconnues seront abordées.

Parmi les techniques communément utilisées pour mesurer la réparation de l'ADN chez les eucaryotes, il existe entre autre l'essai Comète, la méthode UDS, la technique de LM-PCR et la détection par immuno-slot/dot blot. Comme nous allons le voir, certaines de ces

méthodes sont plus simples et versatiles que d'autres pour la détection des dommages, autres que les CPD et 6-4PP.

### I.1.1 L'essai Comète (*Comet Assay*)

L'essai comète, aussi dénommé « *single cell gel electrophoresis* », est une technique permettant de détecter plusieurs types de lésions à l'ADN, comme les cassures simples brins ou les cassures doubles brins. Cette méthode, permet indirectement de refléter l'activité de réparation de l'ADN (Gedik et al., 1992; Singh et al., 1988). Du point de vue de son principe, un petit nombre de cellules sont resuspendues dans une couche mince d'agarose puis lysées et soumises à une électrophorèse, révélant, à l'aide d'un agent fluorescent intercalant de l'ADN, la quantité de dommages. Les cellules présentant un nombre important de dommages à l'ADN ont une migration de la chromatine plus étendue et ressemble à une traîne de comète. Cet essai, selon les conditions de pH utilisées, peut détecter directement les SSB et les DSB et donc permettre de détecter l'activité d'incision des systèmes de réparation de l'ADN comme le NER. En effet, ces dommages peuvent être spécifiquement détectés par l'action spécifique de certaines endonucléases de réparation. L'essai Comète est simple et rapide. Il permet de détecter l'activité du GGNER (Dhawan et al., 2009; Gedik et al., 1992; Sauvaigo et al., 1998) mais aussi, par modifications, celle du TCNER (Spivak et al., 2009) à l'échelle du génome. Même si cette technique est versatile, la mesure de l'activité du NER est indirecte, d'autres systèmes de réparations de l'ADN peuvent être aussi impliqués. Certaines mesures pourraient ne pas refléter la réparation réelle des CPD et de 6-4PP. De plus des processus cellulaires tels que l'apoptose, consistant en une fragmentation de l'ADN, et la replication pourraient également interférer avec la mesure de la réparation observée (Rundell et al., 2003). Il est nécessaire de contrôler l'apoptose lors de ces expériences pour éviter ce biais physiologique. Cette technique, qui peut être automatisée, ne mesure la réparation qu'à l'échelle chromosomique mais peut toutefois être raffinée à l'aide de techniques d'hybridation (Stang et al., 2010)

### I.1.2 Le test UDS (*Unscheduled DNA Synthesis*)

Le test UDS ou la synthèse non programmée de l'ADN, comme son nom l'indique mesure la synthèse de l'ADN en dehors de la phase S. La détection de cette synthèse de l'ADN non programmée («*unscheduled*») fut élaborée et développée par Rasmussen R.E. and Painter R.B. (Rasmussen and Painter, 1964). Le test UDS, au lieu de mesurer la disparition des dommages mesure plutôt l'apparition de l'ADN réparé par le NER. Plus exactement, il mesure l'incorporation d'une base radioactivement marquée dans l'ADN après une exposition aux UV (Cleaver, 1968; Painter and Cleaver, 1969). Cette méthode simple nécessite l'absence de toute réplication de l'ADN, qui pourrait aussi incorporer cette base radiomarquée (en l'occurrence, la thymidine tritiée). C'est pourquoi les cellules doivent être synchronisées au niveau de leur cycle cellulaire en phase G1 (traitement avec l'hydroxyurée, par confluence maximale pour des cellules primaires ou par privation du sérum). Cependant, même si avec cette technique, les cellules en phase S ont incorporé cette base radiomarquée à la fin de l'analyse UDS, cette incorporation sera très importante comparée à celle de l'UDS, ce qui permet toutefois d'exclure facilement les cellules en phase S de l'analyse. Ce test simple, tout comme l'essai Comète, ne permet pas de discerner la réparation des CPD et des 6-4PPs. Dans des temps courts (3-8 heures post-UV), l'UDS reflèterait plutôt la réparation des 6-4PP (Galloway et al., 1994).

Brièvement, les cellules de mammifères sont cultivées et synchronisées en phase G1 afin de s'affranchir de la réplication, puis exposées aux UV et immédiatement mises en présence de thymidine tritiée de 3h à 24h. L'étape de synthèse du brin excisé due à la réparation de l'ADN par le NER sera visualisée par l'incorporation du radio-isotope à l'ADN nouvellement réparé. Cette incorporation reflète directement les niveaux d'ADN réparé. La quantification de la réparation de l'ADN peut se faire par comptage radio-isotopique à scintillations ou par autoradiographie (comptage des grains nucléaires, représentant les sites d'incorporation) (Kelly and Latimer, 2005). Le test UDS mesure principalement l'activité GGNER, et plus minoritairement celle du TCNER (1-10% des sites réparés). La réparation spécifique de chacun de ces systèmes reste difficile à discerner avec cette méthode. En fait, le test UDS reflète une réparation un peu plus rapide que la réalité. Cette méthode présente le désavantage d'avoir recours à une base marquée et nécessite souvent une longue exposition

autoradiographique (plus de deux semaines bien souvent). Cet essai est sensible à l'état physiologique des cellules utilisées. De plus, les écarts-types inter- et intra-expérimentaux sont très importants et résultent en une faible significativité statistique des effets observés.

### 1.1.3 la technique de LM-PCR (Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction)

L'analyse de la réparation par LM-PCR, basée sur la méthode de séquençage génomique a été dérivée pour mesurer la réparation du NER brin spécifique au niveau d'un locus de l'ADN génomique désiré. Plus exactement, dans le but de quantifier la disparition des dommages à l'ADN, cette technique utilise des sondes (ou amorces) d'ADN brin spécifiques (brin transcrit ou non transcrit) en conjonction avec une hybridation de type Southern. Les avantages de cette technique résident dans la capacité de suivre la réparation des 6-4PP (Pfeifer et al., 1991) et des CPD (Pfeifer et al., 1992) et sa capacité de cartographier les sites de dommages à la résolution nucléotidique dans un locus génomique donné.

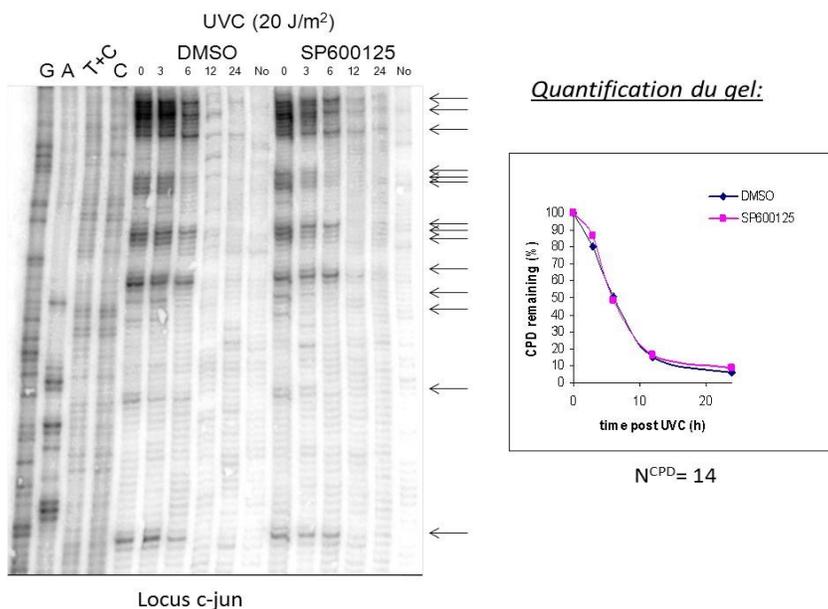
Simplement, cette méthode implique plusieurs étapes de manipulation en commençant par la conversion des lésions à l'ADN génomique en coupures simple brin ligaturables (comme la T4 endonuclease V, produisant spécifiquement une coupure SSB adjacente au site CPD.), suivie par l'extension d'amorces à un locus spécifique (dont la longueur reflète la position des sites converti en cassures simple brin). Ces produits PCR sont ensuite ligaturés avec des *linkers* pour leur amplification. Cette dernière PCR (ou *Ligation-Mediated-PCR*) est nécessaire afin de pouvoir détecter les produits PCR (ou sites de dommages) sur un gel de séquençage. Le plus souvent, la détection se fait par hybridation de type Southern, avec une sonde radiomarquée et spécifique du locus étudié. Cette méthode réduit beaucoup le bruit de fond contrairement à un radiomarquage direct des amorces de LM-PCR. La technique LM-PCR permet de suivre la réparation des 6-4PP et des CPD. Les sites adjacents aux 6-4PP seront détectés par chauffage et traitement à la pipéridine alors que les CPD seront détectés par l'action enzymatique de la T4 endonucléase V (comme précisé en début de paragraphe), hydrolysant en 5' la liaison glycosidique du dimer de pyrimidine. Cette technique a, jusqu'à présent, longuement fait ses preuves tant pour mesurer la réparation des CPD (Pfeifer et al., 1993; Therrien et al., 1999) que pour cartographier les sites de dommages (Tormanen and

Pfeifer, 1992). L'étude de la réparation sur un seul brin et locus spécifique, permise par le LM-PCR, rend possible l'étude de la réparation sur le brin transcrit.

Comme pour les autres méthodes, en dépit de ses avantages non négligeables, cette technique ne permet pas de rendre compte de la réparation à l'échelle globale du génome. Elle ne reflète la réparation que dans un locus donné à un moment donné. Son avantage, ici, devient un inconvénient pour une étude ou une application systématique et répétée. Pour avoir moi-même expérimenté cette approche pendant deux ans au sein de l'équipe du Dr. Drobetsky, cette méthode bien que résolutive, ne permet de générer qu'un petit nombre de données sur un délai de trois semaines. Cependant, la capacité du LM-PCR à suivre ou à discerner la réparation TC-NER ou GGNER avec la même approche technique dans la même expérience ainsi que sa résolution nucléotidique sont des avantages précieux à considérer. Cette technique selon la longueur des gels d'électrophorèses, permet approximativement d'analyser la réparation sur une longueur de 400 à 700 paires de bases. La quantification des dommages sur gel, obtenue par mesure de la densité des bandes, par autoradiographie ou par exposition aux écrans P32 (*StormPhosphoImager*®, *GE Healthcare*) doit être effectuée avec la plus grande minutie et avec un minimum de 20 à 40 sites CPD (**Schéma 9**). De grandes précautions doivent être prises pour ne pas endommager l'ADN génomique durant sa purification (car l'introduction non spécifique de SSB ou DSB sur l'ADN augmentent considérablement le bruit de fond des signaux obtenus). Si on ajoute à cela, la manipulation de radioactivité à l'étape de l'hybridation Southern et la longueur des gels du système d'électrophorèse nécessaire, cette technique est difficile à mettre en place et nécessite un long délai d'optimisation. Même avec ces inconvénients, la technique LM-PCR reste une bonne technique pour étudier la réparation TCNER et GNER locus spécifique mais aussi très utile pour cartographier les sites des autres types de dommages à l'ADN. Cette méthode est également très utile pour générer des empreintes génomiques *in vivo* (*in vivo genomics footprinting*) de promoteurs et ainsi visualiser les sites de liaison de facteurs de transcription sur un promoteur (Rouget et al., 2005).

A présent, la fluorescence a supplanté la radioactivité, et les dommages sont détectés et quantifiés de façon semi-automatique grâce à la technologie Li-Cor (Li-Cor system) (Besaratnia and Pfeifer, 2012). La technique de TD-PCR (PCR dépendant de l'activité

terminal transférase) semble toutefois avoir une meilleure sensibilité que la technique LM-PCR classique (Besaratnia and Pfeifer, 2012).



**Schéma 9:** Exemple d'analyse NER par *Ligation-Mediated-PCR* (LM-PCR) de la réparation des CPD sur le brin transcrit au locus *c-jun* en absence ou en présence de l'inhibiteur JNK1/2, le SP600125.

Succinctement, la réparation de 14 CPD sur 200 nucléotides a été analysée. Le graphique représente la moyenne de réparation de 14 CPD après quantification densitométrique (*Storm phoshoImager*®).

#### I.1.4 La méthode HCR (*Host Cell Reactivation*)

La méthode HCR (*Host Cell Reactivation*) mesure indirectement la réparation des CPD et des 6-4PP, par expression d'un gène rapporteur puisqu'elle mesure une activité enzymatique (activité *reporter*, comme  $\beta$ -galactosidase, luciférase ou aussi la GFP (*Green Fluorescent Protein*)), dont l'apparition et les niveaux reflètent les niveaux de réparation de l'ADN codant cette enzyme ou cette protéine. Plus précisément, le gène rapporteur est codé par un plasmide exogène (ou plasmide rapporteur) endommagé, qui est exprimé dans la cellule. Ce plasmide rapporteur de réparation doit être non répliatif et transfecté (après une

exposition aux UV, afin de générer des CPD et 6-4PP) dans les cellules de mammifères. La persistance des dommages empêche son expression normale. Seule l'élimination des lésions pourra permettre de restaurer pleinement l'expression du gène rapporteur (Johnson and Latimer, 2005; Protic-Sabljić and Kraemer, 1985).

La capacité d'une cellule à réparer les dommages par le NER est exprimée en pourcentage d'activité réactivée du plasmide endommagé par rapport au plasmide intact. Cette méthode simple, en théorie, possède plus d'inconvénients que d'avantages dans l'analyse de l'efficacité de réparation du NER. En effet, en plus de ne mesurer que la réparation sur un plasmide exogène, l'étape de transfection pourrait générer des stress ou des réponses cellulaires inappropriées et ainsi influencer grandement l'efficacité de la cellule à réparer cet ADN exogène. De plus, la nature de la mesure HCR reste controversée, à savoir si cette méthode rend compte plutôt de la réparation du TCNER et/ou plutôt du GGNER (Francis and Rainbow, 1999). Il est toutefois admis que l'approche HCR représente plutôt l'activité TCNER et que l'UDS est plus spécifique pour le GGNER (Pitsikas et al., 2005; Qiao et al., 2002). Néanmoins, dans les premiers temps suivants l'exposition aux UV, l'activité HCR reflète plutôt la réparation TCNER et aussi celle des 6-4PP. De plus, il existe une grande variabilité intra- et inter-expérimentale (Francis and Rainbow, 1999). Même si cette méthode est facilement applicable, elle peut être aussi dérivée de différentes manières afin de détecter l'activité de différents systèmes de réparation, et ce, en fonction de la nature du dommage présent sur le plasmide rapporteur exogène (Slebos and Taylor, 2001). Cette méthode n'est toutefois pas recommandée pour une quantification précise de la réparation et/ou pour l'établissement de cinétiques fiables et proches de la réalité. Il sera préférable d'avoir recours à d'autres techniques d'analyse.

### I.1.5 Immuno-détection des dommages induits par les UV.

Les techniques d'immuno-détection des CPD et des 6-4PP, discutées ci-dessous, n'ont été, bien évidemment permises, que par la génération d'anticorps spécifiquement dirigés contre ces dommages (Matsunaga et al., 1993; Mitchell and Clarkson, 1981; Mori et al., 1991). Ces techniques, contrairement à celles décrites ci-dessus, permettent la détection

directe des dommages à l'ADN grâce à la spécificité des anticorps utilisés. Bien évidemment, les limitations de ces techniques d'immuno-détection résident dans la réactivité croisée (ou réactivité non-voulue) des anticorps utilisés avec les bases non-endommagées de l'ADN. La détection des CPD et des 6-4PP, avec ces méthodes, reflète leur abondance à l'échelle du génome et ne permettent pas de rendre compte spécifiquement de l'activité du TCNER.

#### I.1.5.1 La méthode RIA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*)

Cette méthode de détection des dommages, principalement développée par D.L. Mitchell et ses collaborateurs (Mitchell and Clarkson, 1981) mais initialement créée par R.S. Yalow et S.A. Berson (Yalow and Berson, 1959), est très utilisée pour mesurer et quantifier les dommages à l'ADN. L'atout majeur de cette méthode réside dans sa sensibilité et sa fiabilité. Un certain nombre d'anticorps spécifiques des CPD et/ou des 6-4PP sont, aujourd'hui, commercialement disponibles.

La méthode RIA consiste simplement en une immunoprécipitation de l'ADN génomique fragmenté avec un anticorps spécifique du dommage. Cette approche permet une quantification relativement fiable de la réparation GGNER de ces dommages (Mitchell et al., 1985). Le test RIA a l'avantage de permettre la détection d'une faible quantité de CPD au sein d'un tissu. Cette méthode a le principal désavantage de nécessiter l'isolement de l'ADN génomique ainsi que la manipulation d'ADN radioactivement marqué. Le contrôle de la quantité d'ADN utilisé pour l'analyse est aussi primordial.

#### I.1.5.2 L'essai d'Immuno-dot/slot blot (*Dot/Slot Blot Assay*)

L'essai immuno-dot/slot blot est peut-être la technique la plus facile à utiliser puisqu'elle consiste en une simple immuno-détection sur de l'ADN lié à une membrane de nylon. L'essai immuno-dot/slot blot est certainement l'essai le plus utilisé pour détecter les dommages aux UV (Besaratina et al., 2005; Perdiz et al., 2000; Wani et al., 1987) et a aussi largement prouvé sa fiabilité s'il est correctement et minutieusement contrôlé. En effet, cette

technique de quantification, basée sur les signaux de chimioluminescence (*ECL™*, *GE Healthcare*) ou radioactifs, peut détecter un petit nombre de dommages sur une faible quantité d'ADN. Contrairement à la technique LM-PCR, l'introduction de coupures à l'ADN n'interfère pas avec les résultats observés. Cependant pour avoir également expérimenté cette méthode avec les anticorps anti-CPD (TDM2) et anti-6-4PP (64M1), au-delà de 100 ng d'ADN génomique (déposé sur un slot), les signaux ECL perdent leur linéarité. Il est donc impératif de quantifier l'ADN avec la fluorescence et de travailler avec de grandes dilutions. Il est également recommandé de détecter les dommages avec au moins deux dilutions différentes de l'ADN et de corrélérer ou normaliser ces niveaux à l'aide de deux courbes standards, l'une représentant la quantité d'ADN déposé non endommagé mais aussi, une autre représentant la quantité d'ADN endommagé (préparé immédiatement après exposition aux UV). Il est aussi important d'analyser, parallèlement aux échantillons à étudier, un ADN contrôle provenant de cellules défectives en réparation NER telles que des lignées cellulaires fibroblastiques de patients XPA, XPC ou p53 déficientes (contrôle négatif de la réparation). Globalement, toutes ces précautions doivent permettre de s'assurer de la linéarité des signaux lors de l'analyse de la réparation et ainsi obtenir des cinétiques fiables de réparation. Malgré sa simplicité, cette méthode présente tout de même une grande variabilité intra- et inter-expérimentales, empêchant parfois une interprétation fiable des cinétiques obtenues. Cependant sa faisabilité ainsi que son faible coût en font une technique de choix dans l'étude de l'efficacité du NER.

#### I.1.5.3 La méthode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*)

Tout comme la technique de détection par immuno-dot/slot blot, l'ELISA est également une méthode très utilisée pour quantifier la réparation des CPD et des 6-4PP. En effet, l'ADN génomique endommagé purifié est «coater» (déposé et lié) sur une plaque ELISA et les dommages sont ensuite détectés avec des anticorps anti-CPD et anti-6-4PP pour être finalement quantifiés à l'aide de la fluorescence émise par l'anticorps secondaire (Cooke et al., 2003; Kobayashi et al., 2001; Mori et al., 1991). Cette méthode est un peu plus fiable que l'essai immuno-dot/Slot blot, mais peut être plus difficile à mettre en place pour générer des résultats dans un temps raisonnable et nécessite également une optimisation minutieuse.

Aujourd'hui il existe des kits ELISA commerciaux de quantification des CPD (*OxiSelect Cellular UV-induced damage ELISA kit, Biolabs Inc.*).

Pour améliorer la fiabilité des données obtenues par les méthodes décrites précédemment, par exemple, le LM-PCR peut être combiné à une analyse par immuno-dot/slot blot, ou avec d'autres méthodes, augmentant ainsi la robustesse de l'analyse du NER. Les méthodes d'utilisation moins répandues et plus difficiles à réaliser ne sont pas abordées dans cette thèse par simple souci de concision. Des méthodes comme la quantification des dommages par HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) (Cadet et al., 1983), HPLC-MS (*High pressure Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*) (Douki et al., 2000a; Douki et al., 2000b), GC-MS (*Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry*) (Podmore et al., 1996), mais aussi les techniques plus démodées comme le post-marquage P<sup>32</sup> (*<sup>32</sup>P-postlabeling*) et les gels agarose alcalins (*alkaline gel analysis*). Ces méthodes ont, par ailleurs, toutes démontrées leur utilité selon leur époque et selon l'expertise nécessaire.

En raison des inconvénients des techniques décrites ici, et du projet qui est proposé dans la section suivante, bien que ces dernières soient quantitatives, il nous a été nécessaire de développer une approche plus fiable et plus rapide de mesure de l'activité du NER dans les cellules humaines. Grâce à la commercialisation d'anticorps anti-CPD et anti-6-4PP, et en accord avec le Dr. Yannick Auclair et le Dr. Elliot Drobetsky, nous avons opté plutôt pour le développement et l'optimisation d'un essai de réparation NER basé sur la cytométrie en flux (qui sera décrit en détails dans la section suivante).

## **I.2 Hypothèses et Stratégie**

Compte tenu du rôle fondamental dans la signalisation cellulaire et des fonctions pléiotropiques des voies de stress MAPK, il n'est pas surprenant de constater leur rôle clé dans la réponse cellulaire aux UV. Comme nous l'avons vu, leur activation conduit à la phosphorylation rapide d'un grand nombre de facteur de transcription dont l'activité va moduler les processus d'apoptose et de survie cellulaire (Hildesheim et al., 2004; Reinhardt et

al., 2007). Bien que l'action des voies MAPK sur ces processus dans la réponse UV soit bien documentée, leur action sur la réparation des dommages à l'ADN reste encore clairement à définir. En effet, ces voies de signalisation pourraient ne pas être étrangères à une modulation de la réparation par excision de nucléotides, entre autre par leur action sur la stabilisation et l'activité de p53, étant un régulateur connu de l'activité GGNER (Ford et al., 1998; Ford and Hanawalt, 1995; Mathonnet et al., 2003). De plus, un certain nombre d'études montrent ou suggèrent une participation possible des voies MAPK canoniques, JNK1/2 (Christmann et al., 2007; Christmann et al., 2006; Gjerset et al., 1999; Hayakawa et al., 2003; Potapova et al., 1997), ERK1/2 (Andrieux et al., 2007; Li et al., 2006) et p38 $\alpha/\beta$  (Wang et al., 2013c; Wu et al., 2010; Zhao et al., 2008) à l'efficacité de réparation du NER. Cependant leur implication dans ce contrôle reste encore controversée (Andrieux et al., 2007; Tomicic et al., 2011; Wang et al., 2013c; Wu et al., 2010) entre autre, en raison du fait que les données présentées et analysées furent générées avec différentes méthodes d'analyse de l'activité du NER et aussi avec différents agents de dommages ou de source/dose UV. Pour toutes ces raisons, qui seront discutées plus en détails dans la section I.5, il est proposé dans cette thèse d'établir plus précisément une participation éventuelle des voies de signalisation MAPK dans la régulation de l'excision des dommages à l'ADN induits par les UV.

### I.2.1 Hypothèses et objectifs

Nous avons émis l'hypothèse que les voies MAPK régulent la réparation NER et sont nécessaires pour une excision efficace des CPD et des 6-4PP de l'ADN génomique. Chaque voie canonique MAPK peut potentiellement, à elle seule, participer à l'efficacité du NER après une exposition aux UV et ce indépendamment de ses autres fonctions cellulaires. Autrement dit, après une exposition aux UV, une inhibition de chaque voie MAPK devrait conduire à une diminution de l'efficacité de réparation des CPD et des 6-4PP. Pour cela nous proposons la stratégie expérimentale décrite ci-dessous.

Nos objectifs consistent principalement à inhiber par différentes moyens l'activité MAPK, et de façon aussi complète que possible, dans les lignées cellulaires humaines et d'étudier la disparition des dommages à l'ADN à l'aide d'une méthode d'analyse de la

réparation NER basée sur la cytométrie en flux (technique développée et optimisée dans le laboratoire), et ainsi démontrer le rôle exclusif ou non de chaque voie MAPK sur la réparation des CPD et des 6-4PP induits par une exposition aux UV.

### I.2.2 Stratégie expérimentale

Pour atteindre ces objectifs, nous proposons d'étudier dans des lignées cellulaires humaines; (i) l'effet d'un inhibiteur pharmacologique spécifique pour chaque voie MAPK canonique (JNK1/2, ERK1/2 et p38 $\alpha/\beta$ ) sur l'excision des CPD et des 6-4PP grâce à la cytométrie en flux, (ii) de valider les résultats obtenus grâce à l'utilisation de mutants dominant-négatifs ou à l'expression d'ARN interférants (ARNsi, *siRNA*). Et enfin, (iii) de corréler les effets obtenus sur la réparation avec la réponse UV tels l'apoptose, la croissance cellulaire et le cycle cellulaire.

### I.2.3 Choix des lignées cellulaires humaines

Pour étudier l'existence de moyens de contrôle MAPK-dépendant de l'activité du NER, nous avons décidé de réaliser notre étude dans des lignées cellulaires humaines, et plus particulièrement dans des cellules primaires humaines et des lignées cellulaires tumorales d'origines et de types différents, afin de s'affranchir d'une possible régulation cellule-type spécifique. De plus, nous avons décidé de centrer notre étude aux lignées humaines plutôt que des lignées cellulaires murines ou de type fibroblastique embryonnaire (MEF : *Mouse Embryonic Fibroblasts*) dont certains «knock-out» pour les voies MAPK sont commercialement disponibles. Simplement, en raison de leur inaptitude à exprimer le gène XPE malgré leur bonne capacité de survie clonogénique après une exposition aux UV (effet «rodent repairadox») (Hanawalt, 2001; Hanawalt, 2002). Cet effet, exclu *de facto* toute utilisation des lignées MEF *knock-out* MAPK dans notre étude. Elles ne semblent pas le meilleur modèle pour notre étude d'un contrôle MAPK-dépendant de la réparation par excision de nucléotides. Les lignées cellulaires primaires choisies sont une lignée humaine

normale fibroblastique de peau (GM01652B, HDSF) (venant d'un prépuce de nouveau-né) et une lignée fibroblastique de poumons (HDLF mais aussi nommée LF-1, LL). L'étude dans ces deux lignées primaires devrait nous informer sur un effet ou contrôle cellule type spécifique sur la réparation. Pour les lignées cellulaires humaines d'origine tumorales sélectionnées pour cette étude, nous avons choisis les lignées humaines HCT116 (provenant de carcinomes de colon) et U2OS (provenant d'ostéosarcomes). Toutes ces lignées firent l'objet d'études sur leur réparation des dommages induits par les UV, et sont donc des lignées cellulaires de choix pour la réalisation de notre étude (Caron et al., 2005; Hildesheim et al., 2004; Loignon and Drobetsky, 2002; Loignon et al., 1997).

Bien entendu, des lignées cellulaires de contrôle de la réparation telles que des lignées déficientes dans la fonction du suppresseur de tumeur p53 ou dans la fonction d'un gène NER sont également nécessaires afin de valider les réponses cellulaires ainsi que les résultats de réparation obtenus. Idéalement, les lignées cellulaires contrôles, déficientes en réparation, devraient être isogéniques dans la mesure du possible. C'est pourquoi, nous avons sélectionné la lignée HCT116 p53 déficiente (p53<sup>-/-</sup>, obtenues par *knock-out* somatique, gentiment données par le Dr. B. Volgenstein (*John Hopkins University*), (Bunz et al., 1998; Fearon and Vogelstein, 1990; Ford and Hanawalt, 1995). Ces cellules, en raison de l'action positive de p53 sur l'activité de réparation NER, devraient être altérées en réparation NER et donc nous servir de lignée de contrôle négatif pour la réparation. Pour le contrôle de la lignée U2OS, nous avons établi une lignée cellulaire isogénique stable exprimant un ARN interférant (ARNsh), permettant l'inhibition spécifique de l'expression de p53. Pour les lignées primaires sélectionnées, nous avons utilisé une lignée primaire contrôle fibroblastique déficiente au niveau de l'expression du gène NER essentiel XPA (GM01630). Pour la lignée fibroblastique de poumons, nous avons utilisé une lignée contrôle isogénique exprimant l'oncoprotéine E6 (HDLF-E6), dont la présence réduit drastiquement la stabilité de p53 (Scheffner et al., 1990; Therrien et al., 1999). La comparaison de ces lignées contrôles avec leur lignée correspondante de réparation normale, a permis de valider la technique de réparation utilisée dans l'étude.

#### I.2.4 Choix de la source UV

Comme notre étude se limite à l'étude des dommages induits par les UV, nous avons décidé d'étudier l'action des UVC (254 nm), afin d'éviter le plus possible la génération de dommages oxydatifs induits par les UVB ou par la lumière solaire simulée. La source UVC utilisée provient d'une lampe germicide G25T8 (*GE Healthcare*). En effet, les UVC présentent l'avantage d'induire un niveau raisonnable et détectable de CPD et de 6-4PP sans induire excessivement de dommages oxydatifs, pouvant interférer avec la réparation et la réponse cellulaire obtenues (Cadet et al., 2005; Douki and Cadet, 2001). Pour notre étude, nous avons choisi d'appliquer une dose de  $10 \text{ J/m}^2$  et de fluence  $0.2 \text{ J/m}^2/\text{s}$  d'UVC (la fluence est mesurée avec un radiomètre Spectroline® DRC 100x (*Spectronics, Westbury*), équipé avec un capteur DIX254. La dose appliquée de  $10 \text{ J/m}^2$  est une dose sous-létale pour les lignées cellulaires utilisées (résultats non-montrés). Cette dose UVC, correspond approximativement à une exposition de 20 minutes, mi-juillet à Rome sur la place St-Pierre aux alentours de midi (Yoon et al., 2000).

#### I.2.5 Choix des inhibiteurs pharmacologiques des voies MAPK

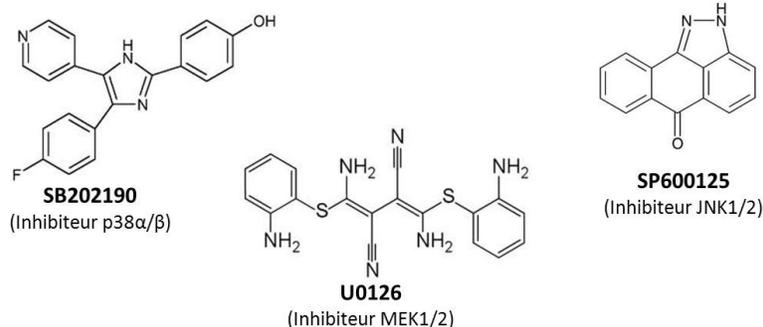
Même si les régions catalytiques (*catalytic core*) des protéines kinases sont relativement bien conservées, les mécanismes d'inhibition des protéines kinases peuvent considérablement varier. Deux types principaux de mécanismes peuvent être utilisés pour inhiber l'activité des protéines kinases. Le premier type d'inhibition par utilisation d'un pseudo-substrat, implique l'occupation d'un peptide inhibiteur qui ressemble au substrat alors que le deuxième type de mécanisme implique plutôt la liaison dans la poche catalytique d'un inhibiteur mimétique de l'adénosine triphosphate (ATP). A ce jour, un grand nombre d'inhibiteurs synthétiques et naturels ont montré leur efficacité, par leur mimétisme avec l'ATP, en empêchant la fixation de l'ATP et le transfert subséquent du phosphate (lorsqu'ils sont utilisés en compétition). Parmi ceux-ci, un certain nombre possède toutefois la capacité d'inhiber seulement et spécifiquement certaines protéines kinases. En effet, les inhibiteurs des voies MAPK couramment utilisés, faisant appel à ce type de mécanismes, peuvent cibler

spécifiquement une voie MAPK canonique JNK1/2, ERK1/2 ou p38 $\alpha$ / $\beta$ . Ce type d'inhibiteur spécifique MAPK permet donc de réduire les effets biologiques non-désirés ou non spécifiques, évitant tout biais potentiel dans l'interprétation des résultats.

Inhibiteurs de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$ : les inhibitions de la voie p38 peuvent s'effectuer grâce à l'utilisation d'inhibiteurs ATP-mimétiques comme les inhibiteurs anti-inflammatoires pyridinyl-imidazoles (SB202190 et le SB203580). Ces inhibiteurs ont une spécificité plus restreinte à la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  (Bain et al., 2007; Lee et al., 1994; Tong et al., 1997) et se lient à la poche ATP de ces kinases. Leur cycle fluorophenyl leur permet d'occuper la poche ATP où se trouve à la position 106 une thréonine ou un résidu de chaîne latérale de petite taille (English and Cobb, 2002; Eyers et al., 1998). Contrairement aux formes p38 $\alpha$  et  $\beta$ , les MAPK p38 $\gamma$  et  $\delta$  possèdent une méthionine à cette position, ce qui les rendent beaucoup moins sensibles aux inhibiteurs pyridinyl-imidazoles. Par exemple, l'inhibiteur SB202190 est inefficace sur l'isoforme p38 $\gamma$  alors que l'inhibiteur SB203580 semble pouvoir l'inhiber, au moins partiellement (Bain et al., 2007). Pour l'inhibition de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  dans notre étude, il a été choisi d'utiliser l'inhibiteur SB202190 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridinyl)1H-imidazole), pour sa capacité à inhiber plus efficacement et plus spécifiquement que le SB203580, les MAPK p38 $\alpha$  et p38 $\beta$ .

Inhibiteur de la voie ERK1/2: Afin d'inhiber la voie ERK1/2, il a été choisi d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques et spécifiques des MAPKK MEK1 et MEK2, nécessaires en amont, à l'activation exclusive des MAPK ERK1 et ERK2. Les inhibiteurs MEK les plus fréquemment utilisés comme le PD98059 ou le U0126 semblent très spécifiques de la voie ERK (Alessi et al., 1995; Bain et al., 2007; Davies et al., 2000). Ces inhibiteurs, contrairement aux inhibiteurs pyridinyl-imidazoles, les inhibiteurs MEK1/2 ne semblent pas entrer en compétition avec l'ATP mais se lient aux isoformes MEK sur un autre site, qui semble toutefois le même pour ces 2 inhibiteurs PD98059 et U0126 (Alessi et al., 1995; Favata et al., 1998). Leur mécanisme moléculaire d'inhibition reste encore incompris. Dans notre cas, pour inhiber la voie ERK1/2, nous avons décidé d'utiliser l'inhibiteur U0126 (1,4-diamono-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthiol]butadiène) en raison de sa meilleure affinité avec MEK1 que le PD98059.

Inhibiteur de la voie JNK1/2 : Comme pour les autres voies MAPK, il existe des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de la voie JNK1/2, comme le SP600125 (anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one ou 1.9-pyrazoloanthrone). Ce dernier, sélectionné pour notre étude, est un inhibiteur réversible des MAPK JNK1, 2 et 3. Tout comme les pyridinyl-imidazoles, l'inhibiteur SP600125 est un inhibiteur compétitif de l'ATP (Bennett et al., 2001; Han et al., 2001). Cet inhibiteur, à des concentrations micromolaires n'exerce pas d'effets sur les autres voies MAPK. Cependant celui-ci est peut-être le moins spécifique des inhibiteurs utilisés dans l'étude présentée dans cette thèse. En effet, les inhibiteurs de la voie JNK1/2 disponibles commercialement sont peu nombreux et le SP600125 reste le plus abordable. Mais, ce dernier peut toutefois inhiber les kinases ERK3, PDK1 et Chk1 (Bain et al., 2007).



**Schéma 10:** Les inhibiteurs pharmacologiques des voies MAPK.

### I.2.6 Choix de la méthode d'analyse de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides: Un essai de réparation NER basé sur la cytométrie en flux

Comme il a été mentionné en fin de section I.1, les techniques couramment utilisées pour quantifier et mesurer la réparation par excision de nucléotides ne nous ont pas semblé assez fiables pour être applicables à l'étude présentée ici, et ce pour plusieurs raisons. La première raison concerne la fiabilité des données récoltées. L'ensemble des techniques majoritairement utilisées présentent une grande variabilité inter- et intra-expérimentales comme les méthodes de dot/slot-blot et de HCR. Cette dernière nécessitant une étape de transfection qui n'est pas souhaitable pour notre étude de signalisation cellulaire et de

réparation. Les autres méthodes plus quantitatives telles que les essais ELISA et RIA peuvent difficilement être optimisées et appliquées au criblage systématique d'inhibiteurs MAPK sur plusieurs lignées cellulaires dans des délais de coûts et de temps raisonnables. La deuxième raison tient compte de la sensibilité de ces techniques classiques d'analyse de la réparation. La dose UV appliquée sur les lignées cellulaires sélectionnées ne doit pas être trop importante et trop létale pour rester dans des conditions physiologiques les plus proches de la réalité (même si l'étude porte exclusivement sur des lignées cellulaires modèles et non sur des tissus cellulaires). Ce qui est, de surcroît, essentiel lorsqu'on analyse la signalisation cellulaire de stress. Les techniques classiques de réparation, de sensibilité moindre, comme le LM-PCR, l'immuno-dot/slot-blot et le HCR nécessitent des doses UV plus élevées et/ou un plus grand nombre de cellules pour être fiables. De plus, il est souhaitable d'utiliser une technique permettant l'analyse de la réparation à l'échelle du génome au complet et si possible à l'échelle de la cellule afin d'améliorer la robustesse de la mesure. Pour la troisième raison, il est important de connaître avec précision le temps de doublement cellulaire des lignées modèles utilisées et de s'assurer de la phase majoritaire du cycle cellulaire (G1, S ou G2/M) au moment de l'exposition aux UV. Plus simplement, tout événement de réplication cellulaire après l'exposition aux UV viendrait diluer les niveaux de CPD ou de 6-4PP détectés, ce qui pourrait potentiellement biaiser fortement l'analyse des données. La réplication cellulaire doit donc être proscrite après l'exposition aux UV. Peu de technique, à ce jour permettent de contrôler la population cellulaire en même temps que la réparation. Le seul moyen de s'affranchir d'un tel effet associé à la réplication cellulaire est de synchroniser les cellules en phase G1 par confluence (pour les lignées cellulaires primaires) ou par privation de sérum afin de s'assurer de la progression lente du cycle cellulaire durant l'analyse de réparation. Idéalement, les cellules ne devraient pas se diviser durant le temps d'analyse de la réparation (mesurée sur des temps de 24 à 48 h pour l'analyse des CPD, et de 6h à 8 h pour les 6-4PP), pour que les résultats soient biologiquement et statistiquement significatifs.

Toutes ces raisons pratiques et techniques nous ont amené à nous tourner vers une approche d'analyse utilisant la cytométrie en flux afin de mesurer la réparation génomique des dommages à l'ADN CPD et 6-4PP à l'échelle de la cellule. Cette méthode, développée et optimisée par le Dr. Yannick Auclair avec ma collaboration, n'a été possible que grâce à la commercialisation d'anticorps anti-CPD (KTM53) et anti-6-4PP (KTM50) (*Kamiya*

*Biomedical Company*). Malheureusement, les autres anticorps commerciaux et non-commerciaux existants, dont les anticorps anti-CPD(TDM2) et anti-6-4PP(64M1), ne se sont pas montrés assez fiables et assez spécifiques pour être utilisés en cytométrie en flux (données non-montrées) (Mori et al., 1991). Ce type d'approche a cependant déjà été utilisée dans le passé sur son principe de détection mais n'a jamais été appliquée à l'étude et l'établissement de mécanismes biologiques de contrôle de la réparation NER (Berg et al., 1995; Berg et al., 1993). Cette approche cytométrique permet de détecter directement les CPD sur l'ADN génomique (partiellement dénaturé) grâce aux anticorps anti-CPD (KTM53) et anti-6-4PP (KTM50), eux-mêmes détectés par un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome FITC (Fluorescéine). Cette méthode optimisée avec ces anticorps dans notre laboratoire s'est avérée être rapide, reproductible mais aussi sensible (**Figure I.3**). Cet essai de réparation fut testé dans un premier temps sur les lignées cellulaires primaires confluentes (synchronisation par confluence marquant un arrêt de division cellulaire où 98 % de cellules se trouve en G1/G0) et dans des lignées cellulaires tumorales (synchronisées par privation de sérum ou par traitement au nocodazole (inhibiteur de la division cellulaire). De plus, grâce à la cytométrie en flux, le co-marquage avec l'iodure de propidium (PI) et l'anticorps dirigé contre le dommage permet d'obtenir les niveaux de dommages dans chaque phase du cycle cellulaire au moment de l'analyse. En effet, le iodure de propidium (*propidium iodide*), par son effet d'agent intercalant à l'ADN, permet de discerner spécifiquement la proportion de cellules en phases G1/G0, S et G2/M. Avant d'étudier l'effet d'une inhibition des voies MAPK sur l'activité NER avec cette méthode d'analyse cytométrique, il est nécessaire de caractériser et de valider cette technique avec des doses croissantes UV et de s'assurer de la linéarité quantitative des signaux observés en fonction de la charge CPD et/ou 6-4PP. Bien entendu, la réponse UV des voies de signalisation MAPK dans les lignées cellulaires proposées doit également être analysée avant de tester les inhibiteurs MAPK sélectionnés sur la réparation NER.

### **I.3 Matériels et Méthodes**

#### **I.3.1 Types et culture cellulaires**

La lignée cellulaire diploïde humaine de fibroblastes de peau, HDSF incluant la lignée sauvage (GM01652B) et la lignée XPA-déficiente (GM01630, déficiente en réparation GGNER et TCNER) ont été commercialement fournies par l'institut Coriell (*Coriell Institute Cell Repository-NIGMS*). La lignée cellulaire primaire humaine de fibroblastes de poumons, HDLF sauvage a été fournie par le Dr. J. Sedivy (*Brown University*) alors que sa contrepartie isogénique p53-déficiente, HDLF-E6 (exprimant de façon stable l'oncoprotéine HPV-E6 et donc partiellement déficiente en réparation GGNER et TCNER), a été générée tel que rapporté dans (Brown et al., 1997; Therrien et al., 1999). Ces lignées humaines primaires ont été cultivées dans un milieu de culture minimum, essentiel et complet MEME (Eagle's Minimum Essential Medium, *Wisent*), supplémenté à 10% avec de sérums fœtal de bovin, de la L-glutamine et des antibiotiques (*Wisent*).

La lignée tumorale de carcinome de colon sauvage HCT116 et sa lignée isogénique p53-déficiente, HCT116 p53<sup>-/-</sup> (générée par *knock-out* somatique) ont été généreusement fournies par B. Vogelstein (*The John Hopkins University*) et cultivées dans un milieu McCoy's 5A (*Wisent*), supplémenté avec 10 % sérum fœtal bovin (*Wisent*), L-glutamine et des antibiotiques. La lignée tumorale humaine d'ostéosarcome U2OS, a été cultivée sur un milieu DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium, *Wisent*) supplémenté également avec 10 % sérum fœtal bovin et antibiotiques (*Wisent*).

#### **I.3.2 Doses et exposition aux UV**

Les tapis cellulaires monocouches ( pétris de 6 cm<sup>2</sup>) ont été lavées 2 fois au PBS 1x (*Phosphate Buffer Saline*), recouverts de 2 ml puis exposées à 10 J/m<sup>2</sup> d'UVC (254 nm) à l'aide d'une lampe germicide G25T8 (*GE*) et d'une fluence de 0,2 J/m<sup>2</sup>/s (mesurée à l'aide d'un radiomètre Spectroline® de type DRC 100x (*Spectronics*), équipé avec un senseur DIX254).

### I.3.3 Inhibition pharmacologique des voies MAPK dans les lignées cellulaires humaines

Les lignées cellulaires non-tumorales HDSF, HDLF et la lignée tumorale HCT116 ont été prétraitées 2 h avant l'exposition aux UV avec soit du DMSO (diméthyle sulfoxyde) comme solvant seul ou soit avec un des inhibiteurs pharmacologiques 30  $\mu$ M SP600125 (*Calbiochem*), 10  $\mu$ M U0126 (*Cell Signaling Technology Inc*) ou 20  $\mu$ M SB202190 (*Calbiochem*), spécifiques des voies JNK1/2, ERK1/2 ou p38 $\alpha$ / $\beta$  respectivement. Immédiatement après l'exposition UV, le PBS 1x est retiré et du milieu frais complet, contenant soit du DMSO ou soit un des inhibiteurs MAPK (préalablement solubilisé et dilué dans le DMSO), est ajouté aux cultures cellulaires, qui sont ensuite incubées jusqu'à leur récolte à différents temps post-UV, nécessaires à l'analyse.

### I.3.4 Inhibition de l'expression des voies ERK1/2 et JNK1/2 par expression transitoire d'ARNsh interférants (en épingle à cheveu) spécifiques

L'abrogation stable de l'expression des voies JNK1/2 et ERK1/2 fut effectuée à l'aide d'ARN interférants, en épingle à cheveu, clonés dans le vecteur pLKO-1-puro ciblant spécifiquement les voies MAPK JNK1 (MAPK8, clone TRCN0000010580), JNK2 (MAPK9, clone TRCN0000001012), ERK1 (MAPK3, clone TRCN0000006150) ou ERK2 (MAPK1, clone TRCN0000010050), et commercialement fournis par *Sigma*. Brièvement, les constructions pLKO-1 JNK1 et JNK2 ainsi que ERK1 et ERK2, ont été mélangées (selon leur cible MAPK respective) et transfectées dans les cellules tumorales U2OS grâce à l'agent de transfection Lipofectamine2000 (*Invitrogen*) selon les instructions du manufacturier. Immédiatement après la sélection antibiotique puromycine (2  $\mu$ g/ $\mu$ L) de 2 jours post-transfection, les cellules U2OS transfectées ont ensuite été incubées de 3-5 h avant l'exposition UV dans un milieu frais dépourvu de sérum et de puromycine. De plus une construction pLKO-1 codant un ARNsh non-spécifique (*scramble*) fut également transfecté comme contrôle de spécificité désigné comme «Control shRNA » dans la **Figure I.5C-B**.

### I.3.5 Inhibition stable de l'expression du suppresseur de tumeur p53 par expression d'un ARNsh interférant (en épingle à cheveu)

Pour réaliser l'inhibition stable de l'expression du suppresseur de tumeur p53, dans les cellules U2OS, une séquence d'ADN spécifique de la région 1095-1115 de l'ARN messager de p53 codant pour un ARNsh est clonée dans le plasmide rétroviral pSuper (*OligoEngine*). Les particules rétrovirales défectives en réplication, ont été produites par transfection transitoire à l'aide de la Lipofectamin2000™ (*Invitrogen*) dans les cellules d'empaquetement PT67 (*Packaging cell line, Clontech*) et récoltées 16 heures après la transfection. Brièvement, la transduction rétrovirale a été effectuée par l'ajout de 8 µg/mL de Polybrène (*Sigma*) aux tubes contenant les particules virales à transduire puis filtrées sur membrane de nitrocellulose 0.22 µm avant d'être ajoutés aux cellules U2OS pour une incubation de 8 h. Une population polyclonale de cellules U2OS exprimant l'ARNsh p53 fut sélectionnée par ajout de 2 µg/mL puromycine (*Sigma*) (après 16 h de transduction rétrovirale) pendant 48 h et maintenues en culture à 1.5 µg/mL puromycine. Avant tout traitement UV, les cellules sont cultivées, 12-24 heures, dans du milieu frais en absence de puromycine.

### I.3.6 Inhibition de la voie p38α/β par expression stable du mutant dominant-négatif p38α(AGF)

L'ADNc de p38α pleine-longueur (GeneBank™ accession number NM\_001315.1) a été amplifié par réaction de Reverse Transcription avec des amorces Oligo(dT) (*Invitrogen*) suivie d'une amplification par Réaction de Polymérisation en Chaîne (RT-PCR) avec l'ADN polymérase *pfu* (*Stratagene*) les amorces sens (GCTGGAAAATGTCTCAGGAAGA) et anti-sens (CTCAGGACTCCATCTCTTCTT). Le produit de RT-PCR obtenu (approximativement 1092 bp) a ensuite été purifié puis cloné avec la T4 DNA ligase (*Invitrogen*) dans le vecteur pMSCVpuro (*Clontech*) par digestion de ce dernier avec l'enzyme *HpaI*. Le dominant négatif p38α (AGF) fut produit par mutagenèse dirigée par PCR (*site-directed mutagenesis*) utilisant l'ADN polymérase *pfu*-Turbo tel que recommandé par le manufacturier et déjà décrit ailleurs (Rouget et al., 2005). Les mutations ponctuelles permettant de muter le site T<sup>180</sup>-G-Y<sup>182</sup> en

A<sup>180</sup>-G-F<sup>182</sup>, furent introduites en 2 étapes grâce aux 2 paires d'amorces mutagéniques et complémentaires (C ACA GAT GAT GAA ATG GCA GGC TAC GTG GCC) avec (GGC CAC GTA GCC TGC CAT TTC ATC ATC TGT G); (GAT GAA ATG GCA GGC TTC GTG GCC ACT AGG TGG) et (CCA CCT AGT GGC CAC GAA GCC TGC CAT TTC ATC). Une lignée polyclonale HDLF, transduite par infection rétrovirale est sélectionnée tel que décrit dans le paragraphe précédent. L'inhibition de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  a été suivie par la phosphorylation de sa cible MK2 par immuno-détection avec l'anticorps MK2 (voir section suivante).

### I.3.7 Analyse de l'activation des voies MAPK par immuno-buvardage (*Western Blotting*)

Les immuno-buvardages ont été réalisés sur les mêmes bases et principes déjà publiés ailleurs avec cependant quelques modifications (Loignon and Drobetsky, 2002). Une membrane PVDF fut utilisée à la place de la nitrocellulose, et les protéines ont été transférées dans des conditions semi-sèches.

Brièvement, l'activation ou l'inhibition pharmacologique des voies MAPK ont été évaluées en détectant les niveaux de phosphorylation des voies MAPK à l'aide des anticorps anti-phospho-ERK1/2 (détectant les phosphorylations ERK1 (44 kDa) sur les résidus (Thr<sup>202</sup> et Tyr<sup>204</sup>) et ERK2 (42 kDa) sur les résidus Thr<sup>185</sup> et Tyr<sup>187</sup> avec une dilution 1/5000); anti-phospho-JNK1/2 (détectant les phosphorylations JNK1(49 kDa) et JNK2 (55 kDa) sur les résidus (Thr<sup>183</sup> et Tyr<sup>185</sup>) et anti-phospho-p38 $\alpha$ / $\beta$  (détectant les phosphorylations p38 $\alpha$  (38 kDa) et p38 $\beta$  (38 kDa) sur les résidus (Thr<sup>180</sup> et Tyr<sup>182</sup>) avec une dilution 1/1000). Ces anticorps ont été utilisés sur les recommandations du manufacturier (*Biosource International Inc.*). L'activation ou l'activité des voies MAPK est également évaluée par immuno-détection des niveaux de phosphorylation des substrats spécifiques de chaque voie MAPK. Ceux-ci ont été fournis *in trans* dans une réaction de kinase *in vitro* en phase solide, grâce aux kits achetés à *Cell signaling Technology Inc.* Globalement, ces kits ont été utilisés pour immuno-précipiter phospho-ERK1/2, JNK1/2 et phospho-p38 $\alpha$ / $\beta$  à l'aide des anticorps fournis par les kits et à partir des extraits cellulaires GM01652B ou autres (traités ou non avec les inhibiteurs

pharmacologiques MAPK). Les MAPK P-ERK1/2, JNK1/2, P-p38 $\alpha$ / $\beta$  immunoprecipitées sont ensuite testées pour leur capacité à phosphoryler Elk-1, c-jun et ATF2 respectivement dans une réaction kinase *in vitro*. Dans l'objectif d'évaluer l'activation de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  *in vivo*, la mesure de l'activation de sa cible spécifique MK2 (MAPKAPK2) dont la forme phosphorylée ou activée par p38 $\alpha$ / $\beta$  affichera un retard de migration par SDS-PAGE et sera immunodétectée avec un anticorps anti-MK2 (*Cell signaling Technology Inc.*). Les vérifications des niveaux d'expression des voies MAPK ERK1/2, JNK1/2, actine et p53 ont été réalisées grâce à l'utilisation des anticorps anti-ERK1/2 (*Santa Cruz Biotech.*), anti-JNK1/2 (*Cell signaling Technology Inc.*), anti-actine et anti-p53-DO1 (*Santa-Cruz Biotech.*). La quantification de l'inhibition de l'activité p38 $\alpha$ / $\beta$  par surexpression du mutant p38 $\alpha$ (AGF) a été effectuée par quantification de la densité des bandes sur gel *in-silico* à l'aide du logiciel Multi-gauge software (*Fuji Corp.*).

### I.3.8 Méthode d'analyse de la réparation NER basée sur la cytométrie en flux

La détermination des cinétiques GGNER a été effectuée dans les cellules humaines par utilisation de la cytométrie en flux. Les cellules HDSF normales (GM01652B) et XPA-déficientes (GM01630) ont été maintenues à confluence pour 4 jours avant le traitement UV et aux inhibiteurs pharmacologiques et maintenues à nouveau confluentes jusqu'aux temps d'analyse de la réparation. Cette synchronisation facile par confluence permet d'obtenir plus 98 % de cellules en phase G1/G0. Pour les cellules HDLF et HCT116, leur synchronisation en phase G1/G0 fut réalisée par privation de sérum (maintenue en culture avec 0.5 % de sérum seulement), afin de ralentir considérablement leur progression cellulaire. La synchronisation des cellules U2OS par privation de sérum n'a pas été possible à cause de la forte mort cellulaire obtenue dans ces conditions. A la place, l'inhibiteur de la division cellulaire, le nocodazole (*Sigma*) 200 ng/mL a été ajouté immédiatement après l'exposition UV, afin de bloquer toutes divisions cellulaires.

A différents temps post-UV, les cellules ont été lavées 2 fois au PBS 1x (*Phosphate Buffer Saline*)/EDTA 50 mM, puis traitées à la trypsine et resuspendues dans 1 mL de PBS/EDTA 50 mM. Ces suspensions cellulaires sont ensuite fixées à l'aide de 3 ml éthanol 99 %

froid. Approximativement  $1.10^6$  cellules fixées sont lavées au PBS/EDTA 50 mM puis perméabilisées par 0.5% Triton-X-100 (*Sigma*) auquel est ajouté de l'acide chlorhydrique HCl 2N (*Sigma*) afin de réaliser une dénaturation acide seulement partielle de l'ADN (démasquant ainsi les dommages induits par les UV et augmente l'accessibilité des anticorps). Alors que la détection optimale des CPD est réalisée avec 2 N HCl, la détection optimale des 6-4PP nécessite une dénaturation partielle de l'ADN moins importante et s'effectue avec 0.1 N HCl seulement. Les cellules fixées sont ensuite incubées 20 minutes à température pièce pour la dénaturation. Les cellules sont ensuite lavées avec 0.1 N de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (pH=9, *Sigma*), dans le but de neutraliser le pH acide de la dénaturation précédente. Après cette neutralisation, les cellules sont lavées deux fois au PBS/EDTA 50 mM, resuspendues dans 1 mL de tampon PBS/EDTA 50 mM contenant 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNaseA (*Sigma*) puis incubées 1 h à 37°C. Les cellules sont ensuite resuspendues dans le tampon d'immuno-hybridation PBS-TB, contenant 1% d'albumine de sérum d'origine bovine (BSA Fraction V, *Roche*), 0.25% Tween 20 (*Sigma*) et du PBS 1x, auquel est ajouté ensuite l'anticorps de souris dirigé soit contre les CPD (KTM53, (*Kamiya Biomedical Company*)) ou soit contre les 6-4PP (KTM50, *Kamiya Biomedical Company*), tous deux dilués dans le PBS-TB à 1/1000 et incubés 1 h à 37°C. Ces anticorps murins sont ensuite détectés à l'aide d'un anticorps anti-souris conjugué avec la fluorescéine (FITC) (*Sigma*), dilué dans le PBS-TB à 1/200, également incubé 1 h à 37°C. Avant et après l'incubation avec l'anticorps secondaire FITC, les cellules sont lavées deux fois avec le tampon PBS-TB puis resuspendues dans 300  $\mu\text{L}$  PBS contenant 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  du iodure de propidium (PI, *MolecularProbes Inc./Invitrogen*) afin de marquer les cellules selon leur contenu ADN avant l'analyse par cytométrie en flux. Succinctement, ce co-marquage avec le iodure de propidium va permettre de cibler ou de délimiter pendant l'analyse les populations cellulaires de la phase G1, afin d'éviter tout biais des autres phases dans l'analyse. Par conséquent les cinétiques de réparation sont établies sur les cellules en phase G1 utilisant la cytométrie en flux FACScan (*Becton-Dickinson*) équipé avec un laser argon et opéré avec le logiciel CellQuestPro® (*Becton-Dickinson*). En effet, l'élimination des CDP et des 6-4PP est obtenue par les intensités de fluorescence FITC par quantification des changements de la moyenne géométrique des pics de fluorescence-FITC au sein de la population G1. Cette élimination indique la réparation, qui est exprimée en pourcentage de réparation.

### I.3.9 Évaluation de la réponse apoptotique, de la survie clonogénique et de la prolifération cellulaire (test MTT) des cellules HDLF

Premièrement, à des temps différents post-UV, l'apoptose a été évaluée par deux types d'analyses, (i) par analyses des pics Sub-G1 par marquage de l'ADN cellulaire au iodure de propidium et, (ii) par marquage extracellulaire Annexin-V à l'aide du kit de marquage (*Annexin V-FITC apoptosis detection kit, Sigma*), sur les recommandations du manufacturier. Brièvement, les cellules HDLF (traitées ou non avec les inhibiteurs pharmacologiques MAPK), Annexin-V positives ou leurs pics Sub-G1 sont analysés et quantifiés par cytométrie en flux avec le cytomètre FACScan tel que décrit précédemment.

Deuxièmement, la détermination de la survie clonogénique et de la prolifération cellulaire ont été conduites avec les cellules HDLF traitées ou non aux inhibiteurs MAPK, par mise en culture du nombre approprié de cellules pour l'analyse correspondante. Succinctement, différents nombres de cellules ont été mises en culture sur des pétris 100-mm ou des plaques de 96 puits, approximativement 6 heures avant tout traitements puis incubées 15 jours ou 4 jours post-UV pour la survie clonogénique (représentant ici la survie et la toxicité cellulaire à long terme) ou pour la prolifération cellulaire (représentant ici plutôt la survie et la toxicité cellulaire à court terme) respectivement. Pour la survie clonogénique après l'incubation de deux semaines les colonies présentes sur les pétris sont dans un premier temps révélées par fixation et coloration au bleu de méthylène (0,5% bleu de méthylène (*Sigma*) dilués dans 50% méthanol/H<sub>2</sub>O) et comptées pour chaque traitement. La survie est exprimée en pourcentage de survie clonogénique par rapport aux cellules contrôles traitées seulement avec le DMSO en absence ou en présence d'un traitement UV.

Pour l'évaluation de la prolifération cellulaire ou la toxicité à court terme, l'essai MTT a été utilisé par incubation des cellules HDLF avec 5 mg/ml 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT) ajoutés au milieu de culture puis incubés pour 6 h (permettant la métabolisation de MTT) avec les cellules avant que le milieu soit retiré pour être remplacé par 100 µL de DMSO. A des temps différents post UV, la métabolisation du MTT, reflétant le nombre de cellules vivantes, est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (*BioTek*) à la longueur d'onde de 550 nm.

## **I.4 Résultats**

### **I.4.1 Activation et Inhibition des voies de signalisation MAPK induites par les UV, dans les lignées cellulaires humaines sélectionnées**

Avant d'appliquer notre méthode de réparation NER à l'étude de l'effet d'une inhibition des voies MAPK JNK1/2, ERK1/2 et p38 $\alpha$ / $\beta$  sur la réparation des CPD et des 6-4PP dans les lignées cellulaires humaines, il est nécessaire de s'assurer que les lignées cellulaires modèles possèdent la capacité d'activer chacune de ces voies MAPK en réponse à une exposition de 10 J/m<sup>2</sup> UVC (254 nm). Cette dernière, conduisant approximativement à 5-10% de survie clonogénique des lignées cellulaires sélectionnées (données non-montrées) est une dose sous-létale et donc adéquate pour l'analyse proposée. En effet, des doses plus élevées risqueraient d'augmenter considérablement les niveaux de stress cellulaires générés par les UV et ainsi biaiser les résultats observés. Il est nécessaire de rester dans des conditions les plus physiologiques que possible. Suivant une exposition à 10 J/m<sup>2</sup> d'UVC (fluence 0,2 J/m<sup>2</sup>/s), les lignées cellulaires tumorales HCT116 et U2OS et non-tumorales HDSF et HDLF, sont collectées à différents temps, jusqu'à 48h suite à l'exposition aux UV, puis examinées pour leur capacité à activer les voies MAPK à l'aide d'anticorps anti phospho-MAPK dirigé contre les voies JNK1/2, ERK1/2 et/ou p38 $\alpha$ / $\beta$  (voir matériels et méthodes, section I.3). Tel qu'indiqué dans la **Figure I.1 et I.2**, les lignées cellulaires sélectionnées montrent une activation transitoire des voies MAPK suite à l'irradiation de 10 J/m<sup>2</sup> UV. En effet, l'immuno-détection de la double phosphorylation dans leur boucle d'activation, reflétant leur niveau d'activité (**Figure I.1A et 1B**), montre clairement une activation des voies JNK1/2, ERK1/2 et p38 $\alpha$ / $\beta$  à des temps précoces suivant l'exposition UV (**Figure I.1A, I.2A-C et I.5A**). Les voies MAPK canoniques montrent aussi, tel qu'attendu, une activation dépendante de la dose UVC appliquée (**Figure Supp.I.1A** en annexe). Plus exactement, les voies MAPK atteignent leur maximum d'activation entre 0,5 h et 1 h et retournent à leur niveau d'activation faible, basal et initial à 48h post-UV. Cependant, même si les lignées non-tumorales HDSF et HDLF montrent toutes deux une activation transitoire et précoce des trois voies MAPK, la lignée tumorale HCT116, choisie pour l'étude, montrent une activation différente de la voie ERK1/2. Il apparaît plutôt une inhibition de la phosphorylation d'ERK1 et ERK2 dans les 5 minutes suivantes l'exposition aux UV, avec un maximum d'activation à 1h qui reste néanmoins peu

différent du niveau basal observé (sous la condition de privation de sérum), (**Figure I.2C**). En plus, de l'activation constitutive de la voie ERK1/2, il n'a pas été possible d'immuno-détecter l'activation de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  suite à l'irradiation UV dans HCT116 (données non-montrées), comme cela fut déjà rapporté (Caron et al., 2005). Ces différences dans les profils d'activation des voies MAPK obtenus avec la lignée HCT116, illustrent et renforcent l'existence d'une activation MAPK qui peut être dépendante du type cellulaire. Avant de procéder plus loin dans l'analyse de la réparation suite à une inhibition des voies MAPK, il est important de contrôler l'efficacité des inhibiteurs pharmacologiques sélectionnés pour l'abrogation spécifique de l'activité ou de l'activation de chaque voie MAPK, induite par les UV.

L'inhibition des voies MAPK à l'aide des inhibiteurs pharmacologiques pour chacune des voies MAPK tels que le SP600125, U0126 et SB202190 (spécifiques pour les voies JNK1/2, ERK1/2 et p38 $\alpha$ / $\beta$  respectivement), montre une forte inhibition de l'activité ou de l'activation MAPK à 1 h post UV tel que montré dans les **Figures I.1C-E et 2B-D**. Plus précisément, l'inhibition des voies MAPK avec 30  $\mu$ M SP600125, 10  $\mu$ M U0126 ou 20  $\mu$ M SB202190 peut être suivie, simplement par l'immuno-détection de l'activation JNK1/2 et de ERK1/2 alors que l'inhibition de l'activation de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  est suivie par l'immuno-détection de la phosphorylation de MK2 (MAPKAPK2), cible de p38 $\alpha$ / $\beta$  à l'aide d'un anticorps anti-MK2, où l'activation p38 $\alpha$ / $\beta$  sera visible par déplacement de migration de MK2 total comme illustré dans les **Figures I.1E et I.2B**. MK2 est activée de façon maximal à 1 h post-UV tel que montré à la **Figure Supp.I.1B**. L'effet de ces inhibiteurs est également vérifié dans les cellules HDSF et HDLF, tel que montré dans les **Figures I.1C-E et I.2B**, par l'activité des voies JNK1/2, ERK1/2 et p38 $\alpha$ / $\beta$  sur leur facteur de transcription respectifs Jun, Elk-1 et ATF2 (phosphorylation *in vitro*, voir paragraphe I.3).

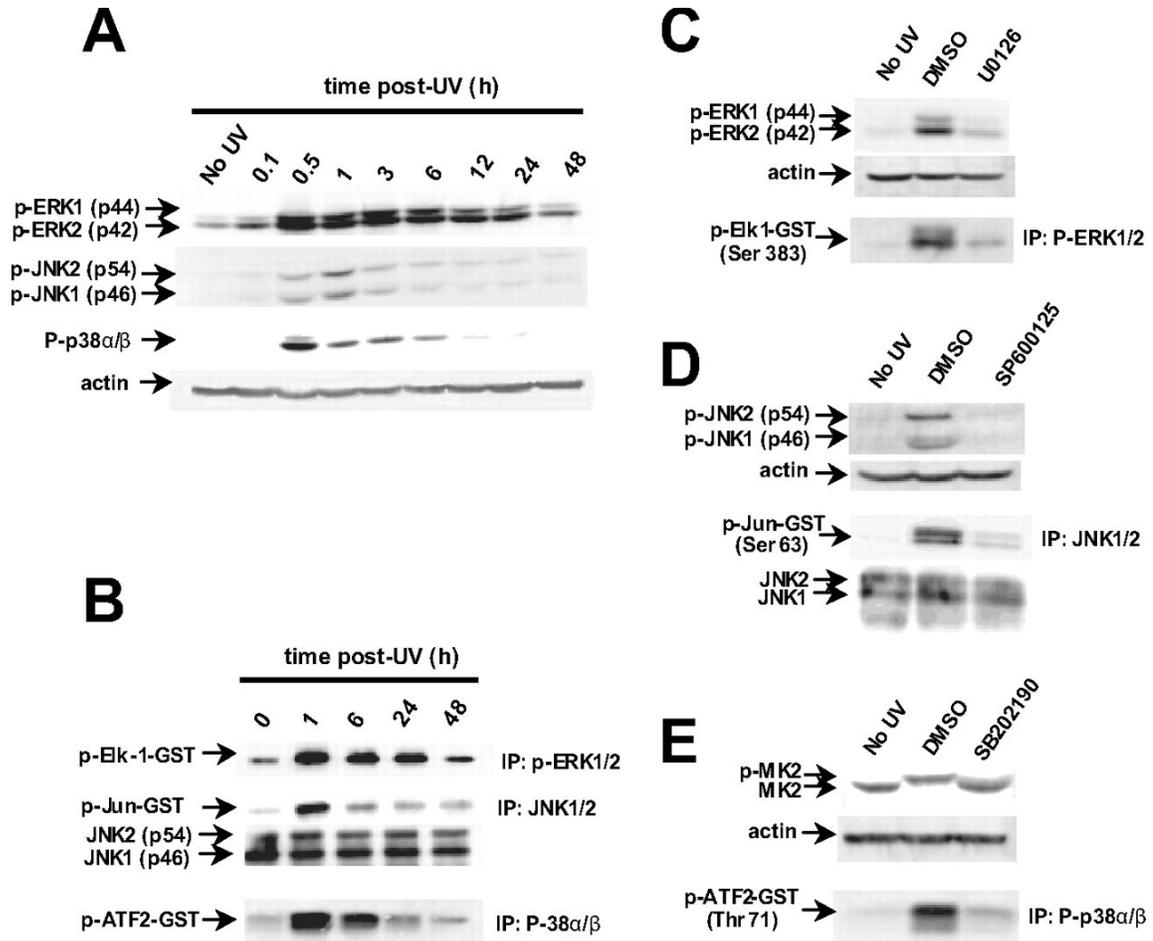
Dans toutes les lignées cellulaires sélectionnées, les inhibiteurs pharmacologiques MAPK, aux doses utilisées, inhibent efficacement l'activation et l'activité des voies MAPK évoquées par les UV dans les lignées cellulaires humaines étudiées (**Figures I.1C-E et Figure I.2B et D**). L'ensemble des résultats présentés dans les **Figures I.1 et I.2** indique que, (i) les lignées cellulaires humaines possèdent toutes la capacité d'activer les 3 voies MAPK JNK1/2, ERK1/2 et p38 $\alpha$ / $\beta$  suite à une irradiation UV, à l'exception de la lignée HCT116, et que, (ii) toutes répondent bien à un traitement pharmacologique avec les inhibiteurs MAPK. Ces

résultats valident et confortent l'utilisation des lignées cellulaires humaines ainsi que des inhibiteurs pharmacologiques MAPK sélectionnés.

#### I.4.2 Optimisation et validation de l'essai de réparation NER basé sur la cytométrie en flux

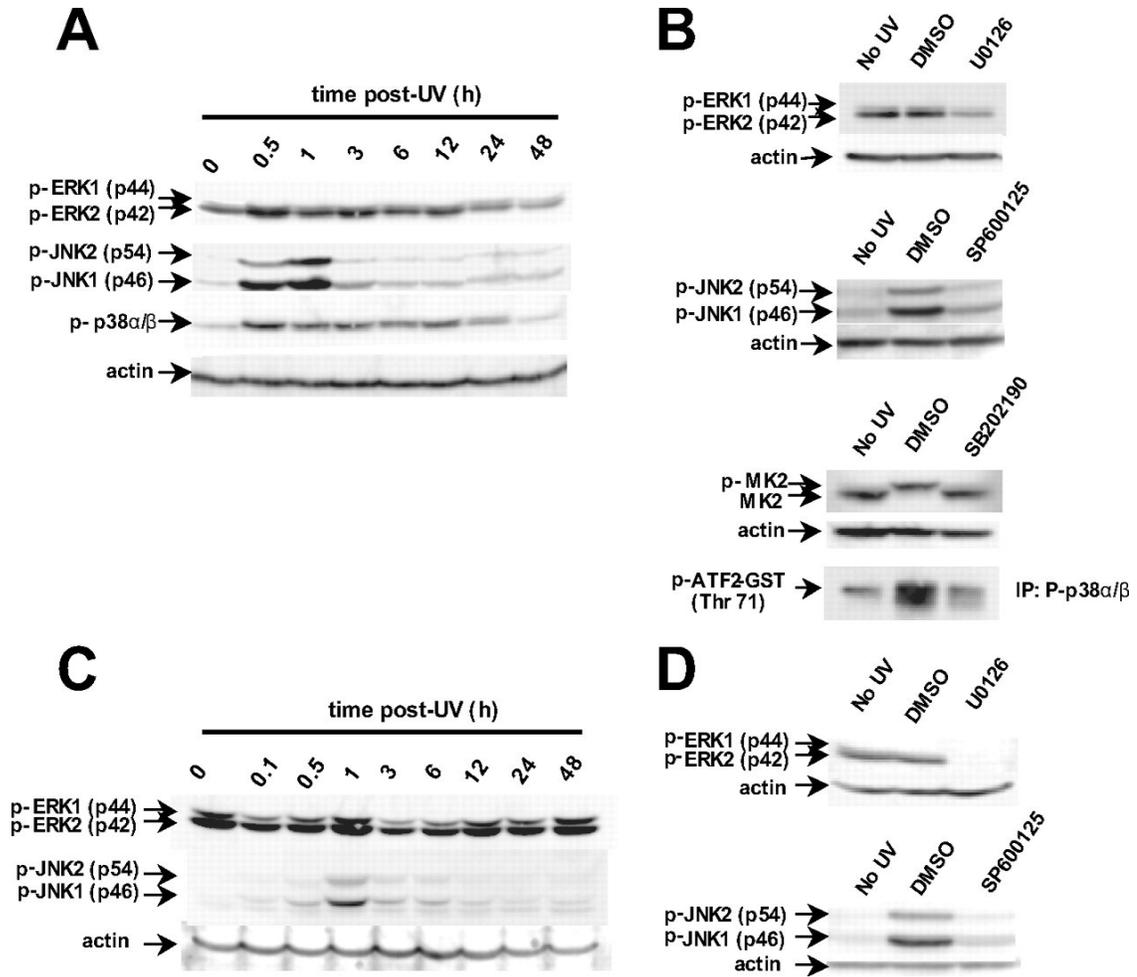
Après ces vérifications, nous avons pu procéder à l'application de notre méthode de réparation basée sur la cytométrie en flux dans les lignées cellulaires humaines non-tumorales et tumorales. Cependant, une optimisation et une validation de la méthode NER s'avère nécessaire afin de s'assurer de la fiabilité et de la précision de cette dernière. Pour cela, il fut nécessaire dans un premier temps de tester la sensibilité de la détection des dommages induits par les UV, les CPD et les 6-4PP, à l'aide des anticorps KTM53 et KTM50 respectivement après l'induction de niveaux croissants de dommages à l'ADN. Brièvement, les cellules HDSF furent exposées à différentes doses d'UVC de 1 à 40 J/m<sup>2</sup>, immédiatement fixée et hybridée avec l'un des anticorps anti-CPD ou anti-6-4PP, pour être finalement analysée par cytométrie en flux au niveau de leur contenu en dommages CPD (CPD content) ou 6-4PP (6-4PP content) à l'échelle de la cellule tel que décrit la section I.3. Comme illustré dans la **Figure I.3A-B**, la détection des niveaux de fluorescence, reflétant le contenu CP ou 6-4PP, à différentes doses UV croissantes, montre une proportionnalité entre les niveaux de fluorescence détectés et les doses UV appliquées. En effet, notre méthode basée sur la cytométrie en flux possède une bonne reproductibilité et semble très sensible puisqu'elle est capable de détecter les CPD ou les 6-4PP avec des niveaux faibles de dommages, même ceux générés avec une dose de 1 J/m<sup>2</sup> UVC. De plus. La méthode démontre clairement une réponse linéaire dans l'induction des CPD et des 6-4PP jusqu'à 40 J/m<sup>2</sup>. Dans l'objectif de valider pleinement cette méthode d'analyse NER, dans un deuxième temps, la cinétique de réparation des CPD, induits par 10 J/m<sup>2</sup>, a été établie dans les cellules HDSF confluentes (arrêtées en phase G1/G0) et dans leur contrepartie déficiente en réparation GGNER et TCNER, les cellules HDSF-XPA, utilisées ici comme contrôle négatif de réparation. Les données brutes présentées dans la **Figure I.3 B-C** montrent une réparation normale des CPD dans les cellules HDSF alors que celle-ci est abrogée dans les cellules HDSF-XPA déficientes. Plus exactement, les cellules HDSF, après

48 h de réparation NER, retiennent encore sur leur ADN génomique 41 % des CPD qui ne sont pas encore complètement excisés. Les résultats bruts représentatifs complets sont illustrés à la **Figure Supp.I.2** en annexe. Ces données brutes sont conformes aux données déjà publiées (Ford et al., 1998; Ford and Hanawalt, 1995; Ford and Hanawalt, 1997) et valident pleinement l'application de notre méthode à l'étude de l'effet des inhibiteurs pharmacologiques des voies MAPK sur l'activité du NER. La méthode de réparation NER s'avère donc être robuste, sensible et reproductible. La technique NER basée sur la cytométrie en flux a été appliquée en premier lieu sur les HDSF confluents afin d'établir la cinétique de réparation des CPD en présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques des voies MAPK SP600125, U0126 ou le SB202190. Tel que montré dans la **Figure I.4A**, un prétraitement et une réparation des dommages à l'ADN en présence des inhibiteurs MAPK n'influencent pas la cinétique de réparation des CPD alors que les cellules HDSF-XPA montrent, comme prévu, une abrogation quasi-complète de la réparation NER même à 48 h post UV. La même procédure expérimentale appliquée, cette fois, aux cellules HDLF et HDLF-E6, montre, tel que graphiquement représenté dans la **Figure I.4B**, la même absence d'effets notables de l'inhibition des voies MAPK sur la réparation des CPD induits par une dose UV de 10 J/m<sup>2</sup>. Conformément à la littérature, les cellules HDLF-E6 présentent une altération de 35%-40% de l'efficacité de la réparation (Ford et al., 1998; Therrien et al., 1999). De plus, dans ces études, l'analyse de la réparation des 6-4PP fut aussi évaluée après une exposition UV de 25 J/m<sup>2</sup> au lieu de 10 J/m<sup>2</sup>, en raison de la faible occurrence (réduite de 5 fois quand comparée aux CPD) de ce type de dommages, hautement distordants. Là aussi, les inhibiteurs MAPK n'exercent aucuns effets notables sur la cinétique de réparation des 6-4PP, qui est dans tous les cas quasi-totale à 8 h post UV, tel que graphiquement représenté dans la **Figure I.4C** et conforme à la littérature (Mitchell et al., 1985; Mitchell and Nairn, 1989).



**Figure I.1: Activation et inhibition pharmacologique de la signalisation MAPK induite par les UV dans des fibroblastes de peau primaires humains (HDSF).**

A. Les cellules HDSF ont été récoltées aux temps indiqués après une exposition à  $10 \text{ J/m}^2$  UVC et analysées par immuno-buvardage de type Western grâce aux anticorps primaires dirigés contre les thréonine et tyrosine phosphorylées des voies JNK1/2, ERK1/2, p38α/β. **B.** Habilité des MAPK ERK1/2, JNK1/2, p38α/β activées induites par les UV, à phosphoryler *in vitro* leurs cibles respectives Elk1-GST, Jun-GST et ATF2 par immuno- précipitation de la MAPK totale ou phosphorylée à partir d'extraits cellulaires totaux. Les niveaux de phosphorylations sont détectés par Immuno-buvardage avec les anticorps indiqués à droite pour l'immuno- précipitation (IP) et à gauche pour l'immuno-détection. **C-E.** Inhibitions pharmacologiques des voies MAPK ERK1/2, JNK1/2, p38α/β induites par  $10 \text{ J/m}^2$  UV. Les cellules ont été traitées ou non aux UV puis récoltées et lysées à 1 h post UV puis analysées au niveau de leur activation et de leur activité. Respectivement par détection de leur activation et de leur activité (tel que décrit précédemment en A. et B.) après un traitement de  $10 \mu\text{M}$  U0126,  $30 \mu\text{M}$  SP600126 et  $20 \mu\text{M}$  SB202190. Cependant, l'inhibition de la voie p38α/β par le SB202190 a été vérifiée par les niveaux de phosphorylation de MK2 à la place des niveaux d'activation de p38α/β grâce l'immuno-détection avec l'anticorps anti-MK2 (**E**). No UV, représente les cellules non exposées aux UV; DMSO, ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) est le véhicule de l'inhibiteur utilisé ici comme référence.



**Figure 1.2:** Activation et inhibition pharmacologique des voies MAPK induites par les UV dans des fibroblastes primaires de poumons (HDLF) et cellules de carcinome de colon HCT116p53<sup>+/+</sup>.

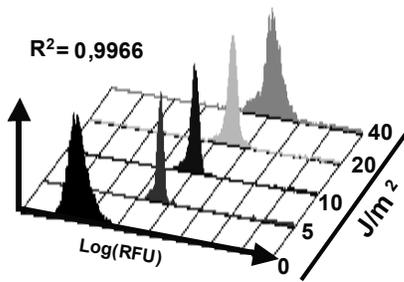
Activation et activité des voies MAPK dans les cellules HDLF (A-B) et les cellules HCT116p53<sup>+/+</sup> (C-D), évaluées tel que décrit dans la légende de la Figure I.1.. Les cellules HDLF ont été récoltées aux temps indiqués après une exposition à 10 J/m<sup>2</sup> UVC et analysées par immuno-buvardage. DMSO, (Me<sub>2</sub>O) ; IP, immuno-précipitation.

Enfin, tout comme les résultats obtenus avec les lignées non tumorales HDSF et HDLF, les cellules tumorales HCT116, synchronisées par privation de sérum, ne montrent aucun effet significatif sur la réparation des CPD en présence des inhibiteurs de la voie JNK1/2 ou ERK1/2, comme le montre les représentations graphiques de la **Figure I.4D**.

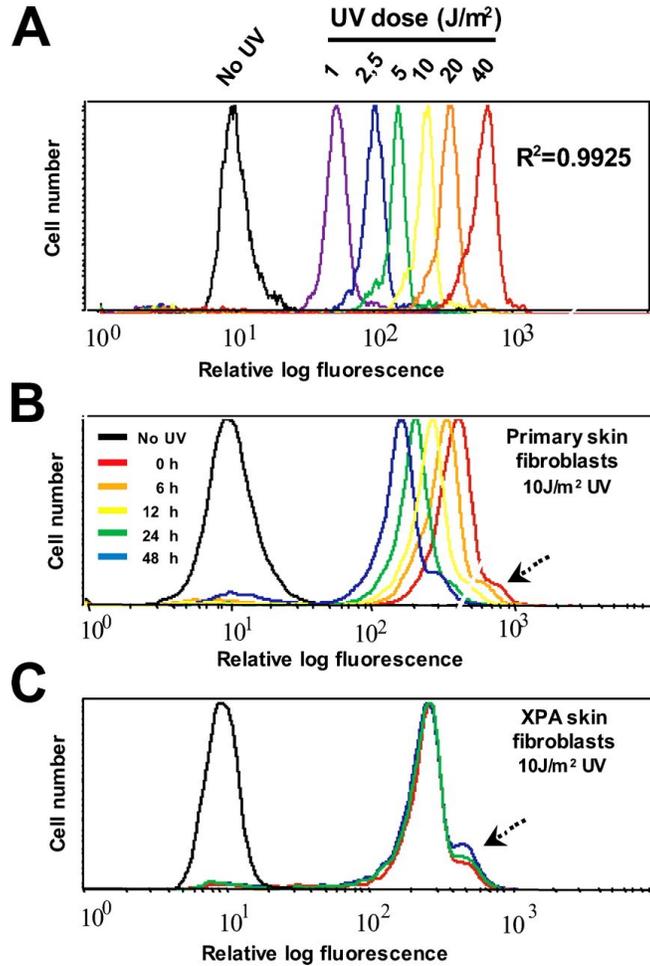
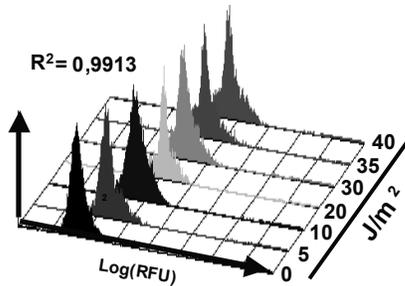
L'ensemble des résultats présentés à la **Figure I.4** montre sans équivoque qu'un traitement, avant et après l'exposition UV, aux inhibiteurs des voies MAPK SP600125, U0216 ou SB202190 n'entraîne aucune modification significative de la cinétique de réparation des CPD et des 6-4PP, au moins jusqu'à 48 h, dans les lignées cellulaires humaines non tumorales et tumorales sélectionnées.

Dans le but de rendre les résultats obtenus, avec les inhibiteurs chimiques, plus robustes et de les confirmer pleinement, il est nécessaire d'utiliser d'autres moyens que simplement une approche pharmacologique. Ces moyens exerceront leur action en diminuant ou en abrogeant l'expression des voies MAPK grâce à l'expression d'ARN interférants en épingle à cheveu (ARNsh) ou alors soit en diminuant l'activation des voies MAPK par expression de mutants MAPK dominant négatifs non-activables. Dans ce but, nous avons exprimé des ARNsh capables d'abroger spécifiquement les voies MAPK JNK1/2 (JNK1/2 shRNA) et ERK1/2 (ERK1/2 shRNA) dans les cellules tumorales U2OS mais aussi un mutant dominant négatif de la voie p38 $\alpha/\beta$ , le mutant p38 $\alpha$ (AGF) (voir paragraphe I.3) dans les HDLF. Les expériences d'expression d'ARNsh ont dû être menées dans les cellules tumorales d'ostéosarcome humain U2OS en raison d'une part, de leur bonne efficacité de transfection (lorsque comparée aux cellules non-tumorales HDSF et HDLF) et d'autre part, de leur meilleure survie cellulaire après l'expression transitoire des ARNsh contre JNK1/2 ou ERK1/2 par rapport à celle observée dans les cellules HCT116. En effet, l'arrêt de croissance et l'importante mort cellulaire, déjà constatés dans d'autres études (Pages et al., 1993), et induite par l'expression de ces ARNsh dans les cellules HCT116 à 24h post-transfection, nous a forcé à remplacer cette lignée par les cellules U2OS, pour cette analyse particulière seulement.

$\alpha$ -CPD  
Détection des CPDs



$\alpha$ -6-4 PP  
Détection des 6-4 PPs

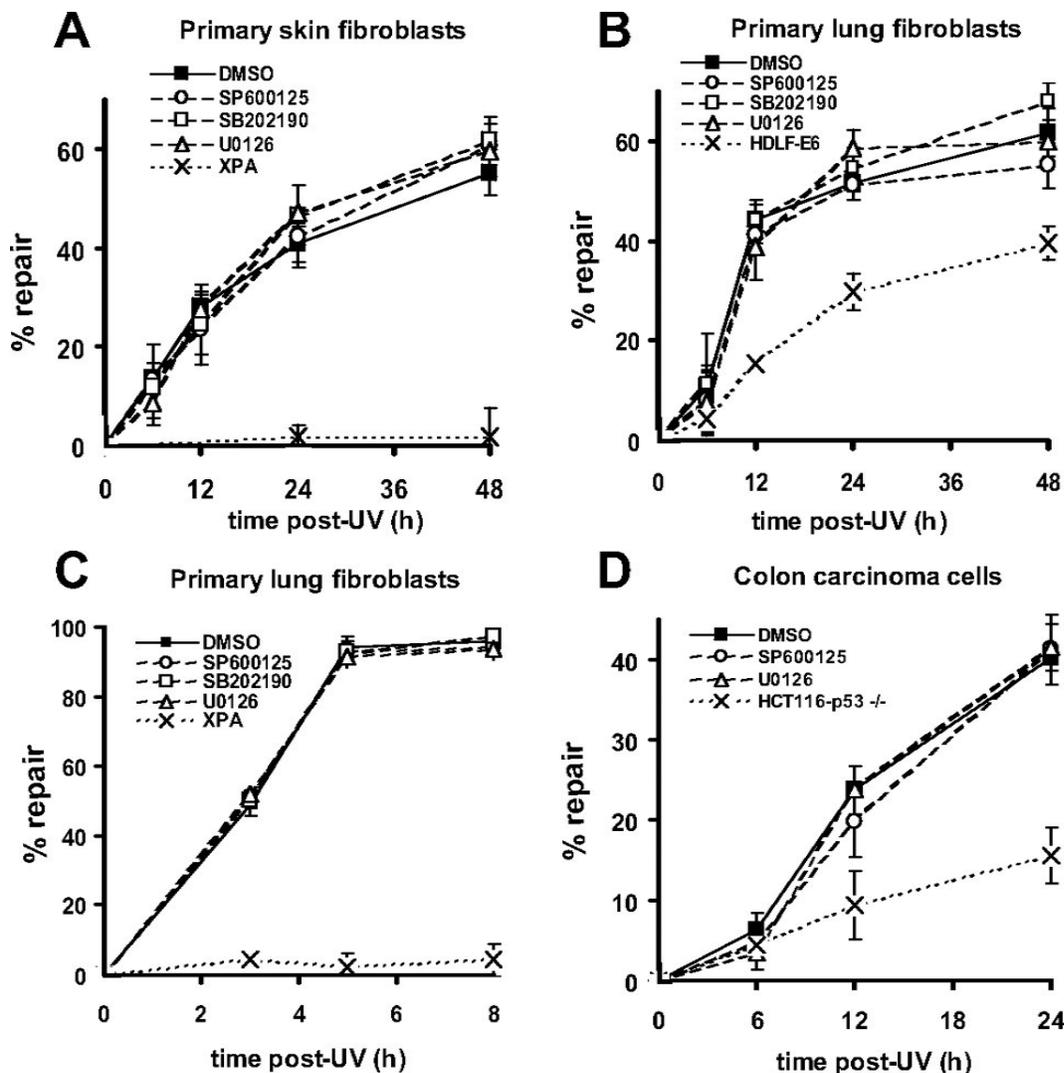


**Figure I.3:** Validation de l'essai de réparation GGNER, basé sur la cytométrie en flux dans les cellules HDSF confluentes.

**A gauche**, Evaluation des anticorps et induction des photo-dommages à l'ADN CPD et 6-4PP à différentes doses UVC dans les cellules HDSF maintenues à 98% de confluence tel qu'indiqué à gauche de chaque groupe de pics d'intensité de fluorescence avec l'anticorps primaire anti-CPD ( $\alpha$ -CPD) ou anti-6-4PP ( $\alpha$ -6-4PP). Les intensités de fluorescence sont indiquées en logarithme décimal d'unités relatives de fluorescence (Log(RFU)). **A droite**, **A**. Induction des CPD à des doses croissantes d'UV de 1 à 40 J/m<sup>2</sup> représentée par l'intensité de fluorescence exprimée en logarithme d'unités relatives de fluorescence (Relative log fluorescence). **B-C**. Données brutes représentatives de la cinétique de la réparation des CPD analysée pendant 48 h suivant l'exposition à 10 J/m<sup>2</sup> UVC dans les cellules normales HDSF normales en réparation GGNER (**B**), et aussi dans les HDSF de patients XP-A (fibroblastes de peau GM01630), de réparation GGNER déficiente, qui sont utilisées ici comme contrôle négatif de réparation GGNER (**C**). L'épaule visible indiquée par la flèche représente probablement les cellules en phase S et G2 où des doublets cellulaires, qui seront exclus des analyses quantitatives par délimitation de la population cellulaire en G1.

Tout comme les cellules non tumorales et tumorales, les cellules U2OS présentent la capacité d'activer les voies MAPK JNK1/2 et ERK1/2 de façon précoce et transitoire suite à une exposition UV de 10 J/m<sup>2</sup> (**Figure I.5A**), et peuvent donc être utilisées pour valider les résultats montrés à la **Figure I.4**.

Brièvement, les cellules U2OS ont été transfectées de façon transitoire, et analysées trois jours plus tard pour leur aptitude à réparer les CPD, de façon similaires aux autres lignées cellulaires de cette étude. Tel que montré à la **Figure I.5B**, l'expression des ARNsh spécifiques de la voie JNK1/2 ou ERK1/2 dans les cellules U2OS conduisent à une abrogation de l'expression de JNK1/2 totaux et ERK1/2 totaux de près de 70-80 % selon les niveaux totaux immuno-déTECTés de ces dernières. De plus un ARNsh spécifique du suppresseur de tumeur p53 a été inclus dans ces expériences comme contrôle négatif en réparation NER. Là aussi, tel qu'illustré à la **Figure I.5B**, l'expression de l'ARNsh de p53 conduit à une diminution drastique de son expression de plus de 80 %. Néanmoins, l'abrogation des voies JNK1/2 et ERK1/2, n'interfèrent pas avec la cinétique de réparation des CPD tel que graphiquement démontré à la **Figure I.5C** alors que la réparation des cellules U2OS exprimant l'ARNsh de p53, montre une inhibition significative d'approximativement 50 % de la réparation CPD à 48 h post-UV. Enfin, toujours dans l'objectif de valider les résultats obtenus avec l'inhibiteur de la voie p38 $\alpha/\beta$ , le SB202190, il a été décidé de réaliser et d'exprimer de façon stable, un mutant dominant négatif de la voie p38, le mutant p38 $\alpha$ (AGF) dans les cellules HDLF par transduction rétrovirale (voir la section I.3). Même si l'expression stable de ce mutant dominant-négatif conduit à une diminution stable et attendue de 5 fois de l'activation de MK2 (Zheng et al., 2006), donnée par l'analyse densitométrique de l'immuno-buvardage présenté à la **Figure I.5D**, l'inactivation de la voie p38 $\alpha/\beta$  n'exerce aucun effet visible sur la cinétique de réparation des CPD. Cependant, tel que prédis, une altération de l'efficacité NER de 50 % est observable avec les cellules HDLF-E6, aussi incluses dans l'analyse comme contrôle négatif.

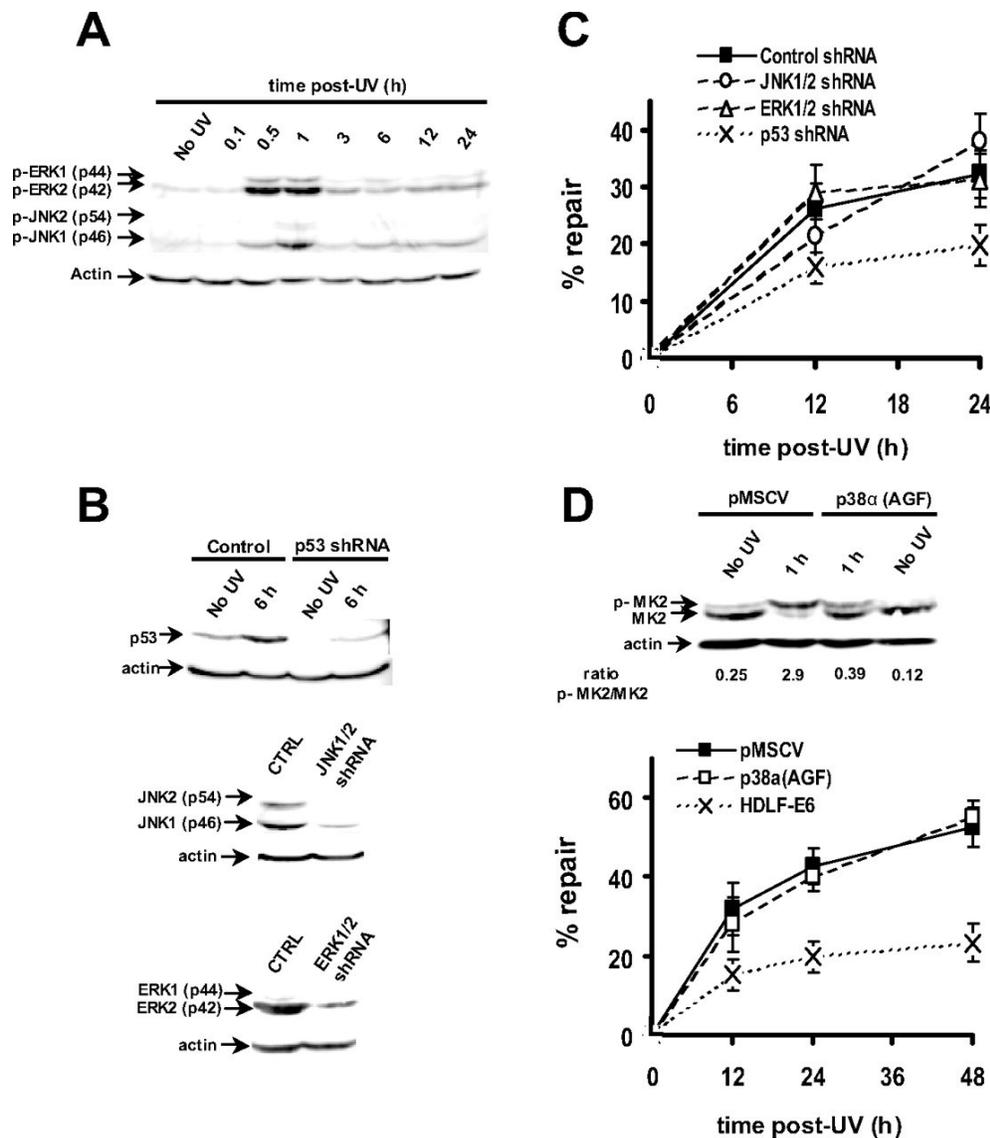


**Figure I.4:** Evaluation de la cinétique de réparation CPD et 6-4PP des cellules humaines primaires et tumorales sélectionnées en absence ou en présence d'un inhibiteur MAPK à l'aide de l'essai de réparation GGNER basé sur la cytométrie en flux.

**A** Evaluation de l'élimination des CPD dans les cellules HDSF et les cellules HDSF XP-A (XPA, contrôle négatif de réparation) en présence ou absence des inhibiteurs MAPK. **B.** Cinétique de réparation des CPD dans les cellules HDLF et HDLF-E6 (exprimant stablement l'oncoprotéine E6, contrôle de défaut de réparation GGNER), en présence ou en absence d'inhibiteurs pharmacologiques MAPK. **C.** Cinétique de réparation des 6-4PP dans les HDSF et HDSF XP-A, en présence ou en absence d'inhibiteurs MAPK. **D.** Cinétique de réparation des CPD dans les cellules tumorales HCT116p53<sup>+/+</sup> et dans leurs homologues déficientes en p53 (HCT116-p53<sup>-/-</sup>), utilisées comme contrôle de défaut de réparation, en présence ou en absence d'inhibiteurs MAPK. Chaque point sur le graphique représente la moyenne de fluorescence de trois expériences indépendantes exprimée en pourcentage  $\pm$  S.E ; DMSO, Me<sub>2</sub>SO.

#### I.4.3 Effet de l'inactivation pharmacologique des voies MAPK sur la mort et la prolifération cellulaire dans la lignée cellulaire non-tumorale HDLF

En raison de l'absence d'effets de l'inactivation des voies MAPK sur la réparation des CPD et des 6-4PP, il est devenu impératif de vérifier que l'inactivation de chacune des voies MAPK conduise aux effets phénotypiques attendus sur la mort et la prolifération cellulaire. Dans cet objectif, l'analyse fut restreinte à l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques des voies MAPK pour faciliter la comparaison en étudiant la même lignée cellulaire tels que les fibroblastes primaires de poumons (HDLF). De plus, à ma connaissance, aucune étude ne s'est encore intéressée à l'effet de chacun des inhibiteurs MAPK sur de tels processus majeurs avant et après l'induction de dommages UV à l'ADN. Cependant, tel que discuté en introduction de cette partie, la réponse UV MAPK peut être assujettie à une grande variabilité dans leur réponse aux UV et leurs actions et effets pourraient dépendre du stimulus (dose UV) mais aussi du type et origine des cellules étudiées. Cet effet cellule type spécifique ne serait pas seulement exclusif à leurs profils d'activation, tel qu'illustré par les cellules HCT116 en réponse aux UV. Par exemple, la voie JNK1/2, originellement associée à l'apoptose induit par les UV, peut avoir une action pro-apoptotique (Chen et al., 1996; Xia et al., 1995), mais aussi anti-apoptotique (Lin, 2003; Liu and Lin, 2005; Yu et al., 2004). Selon la littérature, il semble qu'il en soit de même pour les autres voies MAPK (Ivanov and Ronai, 2000; Tentner et al.). Dans notre cas, un traitement avec l'inhibiteur SP600125 est capable de sensibiliser les cellules HDLF à l'apoptose induite par  $10 \text{ J/m}^2$  à 48 h et 72 h post-UV, tel que représenté par l'analyse de la population cellulaire Sub-G1 dans la **Figure I.6A**. Une analyse plus précise des événements plus précoces d'apoptose, telle que la translocation des phosphatidyl-sérines à la surface externe des cellules, détectées avec l'annexine-V, devrait confirmer et valider les effets des inhibiteurs MAPK sur l'apoptose induite par les UV obtenus précédemment. En effet, les données brutes représentatives présentées à la **Figure Supp.I.3A** en annexe, du marquage annexine-V des cellules traitées ou non par les UV, ainsi que la quantification des populations annexine-V positives, confirment indéniablement que seule l'inhibition de la voie JNK1/2 sensibilise les cellules HDLF à l'apoptose induite par  $10 \text{ J/m}^2$  d'UV comme cela fut



**Figure I.5:** Evaluation de la cinétique de réparation CPD des cellules humaines tumorales U2OS suite à l'inhibition de l'expression des voies MAPK, par utilisation d'ARN interférants contre les voies JNK1/2, ERK1/2 ou par utilisation du mutant dominant négatif p38 $\alpha$ (AGF) dans les cellules primaires HDLF, à l'aide de l'essai de réparation GGNER basé sur la cytométrie en flux.

**A.** Profils d'activation des voies ERK1/2 et JNK1/2 après une exposition UV Cde 10J/m<sup>2</sup> tel qu'indiqué dans la Figure I.1. **B.** Suppression de l'expression des voies ERK1/2 et JNK1/2 par transfection transitoire d'un ARNsh dirigé spécifiquement contre chacune d'entre elles ou exprimant stablement un ARNsh contre p53, (utilisé comme contrôle négatif de réparation) 6 h post-UV. No UV, représente les cellules non exposées aux UV. **C.** Cinétique de réparation des CPD dans les cellules U2OS exprimant transitoirement un ARNsh de JNK1/2 ou ERK1/2 ou p53. **D.** Évaluation de l'inhibition de la voie p38 $\alpha$  par expression stable d'un mutant dominant négatif p38 $\alpha$  (AGF) par immuno-détection avec l'anticorps anti-MK2, permettant de visualiser aussi la forme phosphorylée de MK2 dans les cellules HDLF à 1 h post-UV. Les Ratio p-MK/MK2 ont été calculés à partir de la quantification densitométrique des bandes montrées. Le graphique juste en dessous représente la réparation des CPD dans les cellules HDLF exprimant stablement le vecteur vide (pMSCV) ou le mutants dominant négatif p38 (AGF) ou soit l'oncoprotéine E6. Chaque point représente la moyenne de fluorescence de trois expériences indépendantes exprimées en pourcentage de réparation (%  $\pm$  S.E).

déjà rapporté (Du et al., 2004; Xia et al., 2006). De plus, il semble que cette sensibilisation pourrait être médiée par une induction ou stabilisation de p53 (**Figure Supp.I.3B**) (Brown and Benchimol, 2006; Potapova et al., 2000b). Il est important de signaler qu'il reste difficile de statuer sur les effets spécifiques du SP600125 qui pourraient être biaisés par une inhibition d'autres protéines kinases (Bain et al., 2007). En revanche, en dehors du rôle anti-apoptotique de l'inhibition de la voie JNK1/2, il semble que l'inhibition de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  par le SB202190 puisse réduire très faiblement l'apoptose induite par les UV, visible et statistiquement significatif seulement à 72 post-UV (**Figure I.6B**). La voie p38 $\alpha$ / $\beta$ , contrairement à la voie JNK1/2, aurait peut-être un rôle légèrement apoptotique dans notre système cellulaire HDLF.

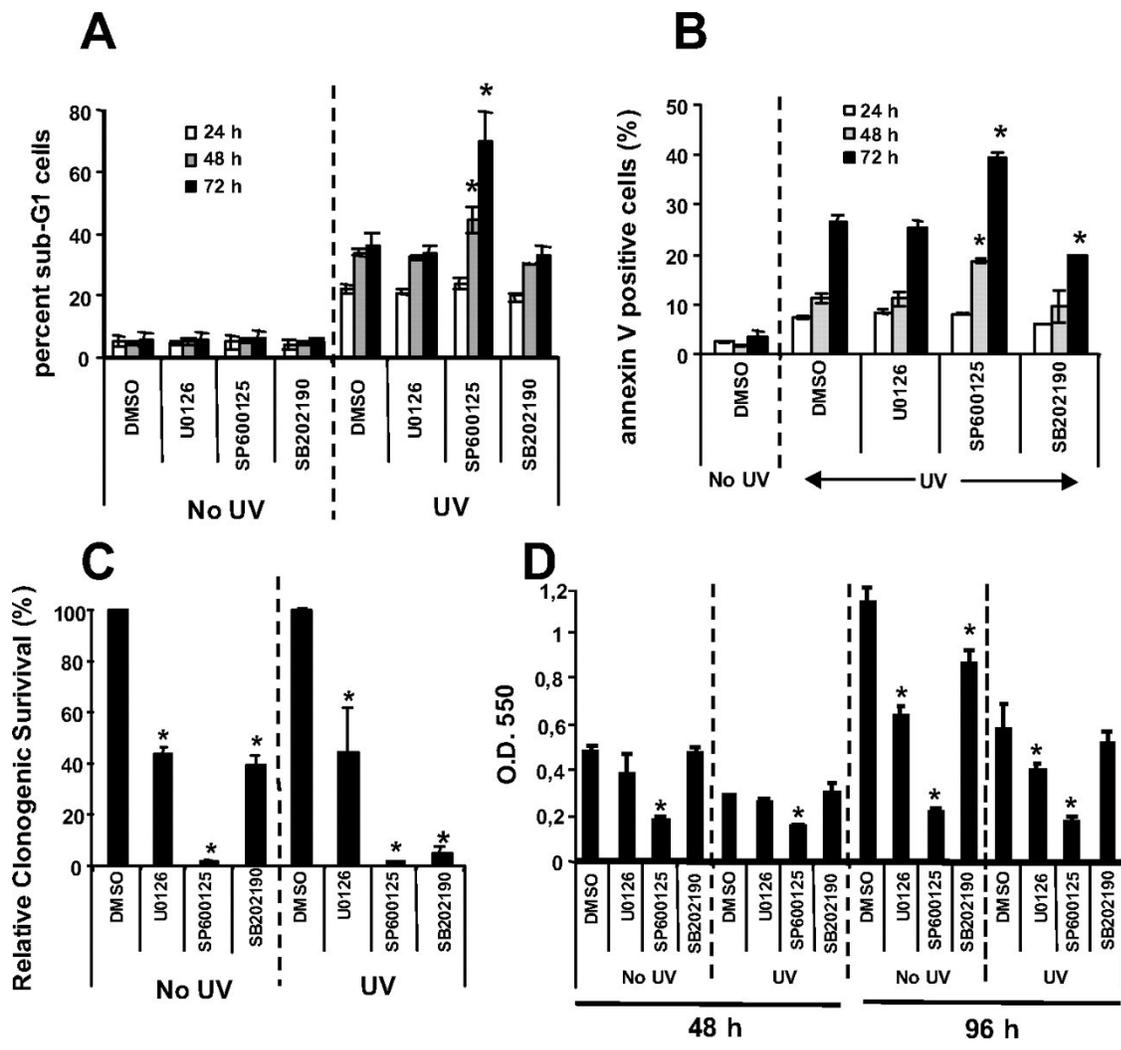
Enfin, les analyses de la survie et de la prolifération cellulaire, à court terme et long terme post-UV, ont été testées par un essai de survie clonogénique et par un test MTT respectivement, en présence et en absence de chacun des inhibiteurs MAPK. Ces analyses, telles que présentées dans la **Figure I.6C-D**, confirment globalement les résultats précédents obtenus de l'apoptose induite par les UV en présence d'inhibiteurs. D'ailleurs, il est intéressant de constater que chaque inhibiteur MAPK appliqué, affecte notablement la survie clonogénique des HDLF, avec un effet majeur du SP600125, et ce, même en absence d'une exposition UV (**Figure I.6C**) contrairement au SB202190, qui démontre un effet plus marqué et révélé seulement après une exposition UV.

A plus court terme, l'analyse de la prolifération cellulaire par un test MTT confirme les résultats de survie clonogénique et d'apoptose, et révèle aussi un effet important du SP600125 (**Figure I.6D**). De plus, une diminution beaucoup plus modérée mais statistiquement significative de la prolifération cellulaire, en absence dommages à l'ADN, est également observée après un traitement avec les inhibiteurs U0126 et le SB202190.

L'ensemble des résultats, présentés dans les **Figure I.6** montre les effets notables et importants de l'inactivation de voies MAPK sur la mort cellulaire, la prolifération cellulaire ainsi que la survie à long terme (survie clonogénique) des HDLF, en dépit de tout effet sur la réparation GGNER des dommages à l'ADN. Ces résultats sont en accord avec les données expérimentales disponibles dans la littérature et pourraient être expliqués par l'effet des inhibiteurs MAPK sur le cycle cellulaire des HDLF et des HDSF (voir **Figures Supp.I.4 et Supp.I.5**).

## **I.5 Discussion**

Cette étude montre de façon évidente que l'abrogation de l'activité des voies de signalisation MAPK ERK1/2, JNK1/2 ou p38 $\alpha$ / $\beta$ , dans les cellules humaines non-tumorales et tumorales, n'entraîne aucune modification de l'efficacité de réparation GGNER des CPD et des 6-4PP. Cette conclusion, obtenue par utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des voies MAPK, est établie d'une part par l'absence d'effets sur la réparation GGNER de l'expression d'ARNsh JNK1/2 ou ERK1/2 dans les cellules tumorales U2OS, mais aussi par l'expression d'un mutant dominant négatif p38 $\alpha$ (AGF) dans les cellules normales primaires HDLF. Cependant, il est important de noter que l'absence d'une participation des voies MAPK à la réparation GGNER fut dans un premier temps non-attendue, en raison des études antérieures publiées et aussi récentes, montrant une participation des voies JNK1/2 (Christmann et al., 2007; Christmann et al., 2006; Tomicic et al., 2011), mais aussi des voies ERK1/2 (Andrieux et al., 2007; Li et al., 2006) ou des voies p38 $\alpha$ / $\beta$  (Wang et al., 2013c; Wu et al., 2010; Zhao et al., 2008) à la réparation des dommages à l'ADN induits par les UV. Plus exactement, il est suggéré que les voies JNK1/2 participent à la réparation GGNER via le facteur de transcription c-Fos, nécessaire à l'expression du facteur NER XPF (Christmann et al., 2007; Tomicic et al., 2011). De plus, les auteurs, utilisant également l'inhibiteur JNK1/2 SP600125, rapportent que l'activation de la voie JNK1/2 stimule la réparation des CPD et protégerait contre l'apoptose induite par les UVC (20 J/m<sup>2</sup>) (Christmann et al., 2006). Cette différence ou contradiction avec les données présentées dans cette thèse concernant la participation de la voie JNK1/2 à la réparation GGNER pourrait s'expliquer dans un premier temps par le modèle cellulaire murin utilisé (MEF c-fos<sup>-/-</sup>), révélant ainsi un effet d'espèce dans le contrôle des voies MAPK sur la réparation NER. Mais pas seulement, car récemment une étude similaire du même groupe, et avec les mêmes conclusions, a été conduite dans des lignées tumorales humaines (Tomicic et al., 2011). Dans cette dernière, l'abrogation de c-Fos par ARNsi (dans les cellules humaines (VH10tert) ou sa surexpression (dans des fibroblastes humain, GM636), montrent respectivement une inhibition et une augmentation de la réparation des CPD mais pas des 6-4PP, via une modulation de l'expression de XPF par c-Fos. Comme nous allons le voir, les auteurs de ces études pourraient toutefois mesurer les effets de la modulation de l'expression de c-Fos sur la replication et non la réparation des CPD.



**Figure I.6: Modulation de la mort cellulaire et de la prolifération cellulaire par une inhibition pharmacologique de l'activité MAPK basale et induite par 10 J/m<sup>2</sup> UV dans les cellules humaines primaires HDLF.**

A. Evaluation de la population Sub-G1 visualisées à différents temps post-UV en absence ou en présence d'inhibiteurs MAPK dans les cellules HDLF exposées ou non aux UV. Au temps, indiqués, les cellules ont été fixées et marquées au iodure de propidium puis analysées par cytométrie en flux. B. Quantification des cellules Annexin-V positives à différents temps post-traitement en absence ou en présence d'inhibiteurs MAPK dans les cellules HDLF exposées ou non aux UV. C. Effet de l'inhibition des voies MAPK sur la survie clonogénique des cellules HDLF exposées ou non à 10 J/m<sup>2</sup> UV. D. Effet de l'inhibition des voies MAPK sur la prolifération cellulaire et toxicité des cellules HDLF exposées à 10 J/m<sup>2</sup> par le test MTT à 48 h et 96 h post UV (tel que décrit dans la section I.3.9). Tous les résultats présentés représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ± S.E; \*, indique une différence significative révélée par le test t-student bilatérale p< 0.05; DMSO; Me<sub>2</sub>SO

Plus exactement, comme mentionné, tout évènement de réplication conduirait à une dilution des CPD, et pourrait générer une fausse impression de réparation. D'ailleurs, les auteurs montrent que l'incorporation BrdU est beaucoup plus réduite dans les cellules MEF c-fos-déficientes que dans les cellules MEF sauvages (Christmann et al., 2007). Le manque de contrôle de la progression du cycle cellulaire aux temps de réparation analysés par la méthode d'immuno-dot/slot blot dans les 3 études du même groupe (Christmann et al., 2007; Christmann et al., 2006; Tomicic et al., 2011), pourrait suggérer une fausse impression de réduction de l'activité NER telle qu'observée dans les cellules MEF c-fos<sup>-/-</sup>. De plus, le rôle positif de l'activation de JNK sur la réparation NER a été mis en évidence seulement par utilisation du SP600125. En raison, de la méthode de réparation utilisée, du manque de contrôles pertinents et d'une approche pharmacologique unique, il est difficile de comparer nos données avec les études citées juste au-dessus. En dehors de celles-ci, il a été aussi légitimement suggéré que l'activation JNK1/2 serait nécessaire au retrait des dommages à l'ADN induits par le Cisplatine via le facteur de transcription ATF-2 (Gjerset et al., 1999; Hayakawa et al., 2003; Potapova et al., 1997). Cet agent de dommages génère un panel de lésions dont les pontages intercaténaux, qui ne sont pas exclusivement réparés par le NER, mais nécessitent l'action concertée de plusieurs systèmes de réparation dont le NER, la recombinaison homologe (HR), le système de réparation par excision de bases (BER), la réparation par synthèse translésionnelle (*TLS*, *translesion synthesis*, voir Partie II) et le système de réparation des mésappariements de bases (MMR) (Vasquez, 2010). Ces systèmes, à l'exclusion de NER, pourraient être influencés par les voies de signalisation MAPK. De plus, ces études, basées sur la réparation des dommages à l'ADN du Cisplatine, ont eu recours à une méthode d'analyse de la réparation indirecte, par un essai PCR-stop (*PCR stop assay*), (basé sur le même principe que le LM-PCR) et rend ici aussi, nos données (de mesure directe de la réparation NER) difficilement comparables.

Contrairement aux données présentées dans cette thèse, la voie ERK1/2 a aussi été rapportée comme modulatrice de l'efficacité de réparation des CPD (Andrieux et al., 2007). En effet, l'activation et la signalisation ERK2, induites par le facteur de croissance EGF (*Epidermal Growth Factor*), serait nécessaire à l'expression du gène NER ERCC1 via le facteur de transcription GATA-1, dont le produit ERCC1 joue un rôle important dans l'étape

d'incision de NER. Une activation de la voie ERK1/2 par l'EGF semble augmenter l'activité de réparation des CPD et l'abrogation de cette voie, à l'aide de l'inhibiteur U0126, conduit à une diminution notable de l'expression du facteur NER ERCC-1. Cependant, même si la signalisation ERK1/2 semble nécessaire à l'activité biologique ERCC1, comme cela fut déjà rapporté (Chang et al., 2005; Yacoub et al., 2003; Yacoub et al., 2001), la méthode d'analyse par réactivation de plasmides exogènes (HCR) employée, montre une significativité statistique seulement à 80 J/m<sup>2</sup> mais aucune à 40 J/m<sup>2</sup>, 60 J/m<sup>2</sup> et 120 J/m<sup>2</sup>, et fut seulement analysée à 24h post-UV (Andrieux et al., 2007). Cette méthode reste une technique indirecte qui pourrait plus refléter plutôt l'activité TCNER que l'activité GGNER. Ces auteurs indiquent aussi qu'un traitement à l'EGF augmente la prolifération cellulaire. Il se pourrait donc que, en plus de la mesure indirecte de la réparation, ces auteurs pourraient mesurer, ici aussi, une réparation aberrante en raison de l'augmentation de la progression cellulaire.

Tout comme les voies JNK1/2 et ERK1/2, la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  fut rapportée, encore récemment, comme un régulateur de la voie NER (Wang et al., 2013c; Wu et al., 2010; Zhao et al., 2008). Jusqu'à récemment, aucun rôle de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  sur la réparation NER n'avait été mis en évidence. En effet, peu après la publication des résultats de cette thèse, une étude a rapporté une participation de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  à la réparation des CPD seulement. Ce contrôle implique un effet négatif de l'inhibition de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  sur la réparation et sur la dégradation de facteur de reconnaissance NER, DDB2. Beaucoup plus récemment, il est montré que cette voie de signalisation aurait un rôle positif sur la réparation NER en agissant indirectement, via la phosphorylation de p300HAT (*Histone Acetyl Transferase*), sur la relaxation de la chromatine (Wang et al., 2013c). Il est important de considérer d'une part, que les auteurs de cette dernière étude n'ont jamais retesté, tel que publié antérieurement, directement le rôle de la voie p38 sur ce mécanisme dans leur analyse de réparation, et utilisent seulement des ARNsi p300HAT. D'autre part, que les effets rapportés de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  sur la réparation sont tous très indirects. Plus exactement, les données d'immuno-dot/slot blot montrant qu'une inactivation de cette voie entraîne une réduction de la réparation de CPD et non des 6-4PP n'ont été réalisées qu'en présence de l'inhibiteur SB203580 et n'aborde à aucun moment une participation possible d'autres voies de signalisation dans les effets observés. La présentation des résultats d'immuno-dot/slot blot de la réparation révèle certaines incertitudes quant à la spécificité de l'anticorps sur l'ADN non-exposés aux UV, car ces contrôles ne sont jamais

montrés (Wang et al., 2013c; Zhao et al., 2008). Même si ces deux dernières études, réalisées dans des cellules humaines émanent du même groupe, toutefois une étude récente, conduite dans les cellules de souris knock-out, montre une participation exclusive de la voie p38 $\gamma$  au contrôle du NER et exclue une participation des voies p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\delta$  (Wu et al., 2010). Cette participation unique de p38 $\gamma$ , révélée par les cellules MEF p38 $\gamma^{-/-}$ , présente cependant quelques faiblesses. Premièrement, l'utilisation du test HCR et les conclusions établies auraient nécessité la démonstration que les processus de transcription et de réplication ne sont pas affectés dans ces cellules étudiées aux temps de réparation analysés (même en absence de dommages à l'ADN, évitant ainsi de biaiser les résultats de HCR). En conclusion, jusqu'à présent les études existantes, impliquant la voie p38 $\alpha/\beta$  dans la réparation NER, auraient besoin d'être revisitées et démontrées par des moyens pharmacologiques et génétiques dans le même modèle cellulaire. Ici aussi, il reste difficile de comparer nos résultats avec ces études pour toutes les raisons mentionnées.

L'absence de tout effet de l'inhibition de l'activité MAPK sur la réparation des dommages induits par les UV, précisément démontré dans cette thèse, n'invalide pas forcément les résultats rapportés dans les autres études, car même si nous ne l'avons pas constaté, il reste toujours la possibilité d'un contrôle du NER par les MAPK dépendant de type cellulaire. Il est également impossible d'exclure un rôle de p38 $\gamma$  sur la réparation NER car l'inhibiteur SB203580, utilisé dans les études mentionnées ci-dessus, peut inhiber p38 $\gamma$  alors que le SB202190 semble avoir une activité plus restreinte à p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  (Bain et al., 2007), comme mentionné dans la section I.2 de cette partie.

Néanmoins, les effets obtenus sur la réparation avec les inhibiteurs MAPK rapportés dans les études, discutées dans le paragraphe précédent, concernant une participation des voies JNK1/2 (Christmann et al., 2007; Christmann et al., 2006; Tomicic et al., 2011), ERK1 (Andrieux et al., 2007) et p38 $\alpha/\beta/\gamma$  (Wang et al., 2013c; Wu et al., 2010; Zhao et al., 2008) à la réparation NER, pourraient s'expliquer. En effet, les résultats publiés auraient pu être biaisés par des modifications de la progression cellulaire induites par une inhibition des voies MAPK, donnant une fausse impression d'un défaut de réparation. Plus exactement, les activités basales de JNK1/2, ERK1/2 et p38 $\alpha/\beta$  semblent nécessaires à la régulation du cycle cellulaire, dans la transition G1/S, la progression en phase S et aussi la mitose (Du et al., 2004; MacCorkle and

Tan, 2005; Mikhailov et al., 2005; Potapova et al., 2000a; Xia et al., 2006). Comme présenté en annexe à la **Figure Supp.I.4A**, l'inhibition basale JNK1/2 à l'aide de l'inhibiteur SP600125, induit 24 h après traitement une réduction notable de la phase S, accompagnée d'une augmentation de la phase G2/M et d'une endo-duplication des HDLF non-exposés aux UV. Cette inhibition de la progression cellulaire induite par le SP600125 a déjà été rapportés ailleurs (Du et al., 2004; Hideshima et al., 2003; Mingo-Sion et al., 2004). De plus, l'activité basale ERK1/2 est connue pour être essentielle et régule la survie et la prolifération cellulaire (Brunet et al., 1999; Caron et al., 2005; Ussar and Voss, 2004). Un traitement avec le U0126 dans des cellules HDLF et HCT116 non-stressées induit un léger retard de la transition G1/S tel qu'attendu (**Annexe-Figure Supp.I.4C** et **Figure Supp.I.5**). Ces résultats sur les cellules modèles sélectionnées, sont en accord avec une rôle de l'activation MEK1 dans la transition G1/S, alors que celle de MEK2 conduirait plutôt à un arrêt en G1 (Bartek and Lukas, 2001; Pumiglia and Decker, 1997). Ces données sont donc en accord avec un rôle positif de l'activité ERK1/2 sur la progression G1/S et la prolifération cellulaire (Brown and Benchimol, 2006; Liu et al., 2004). Tout comme les autres voies MAPK, l'inhibition basale de la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  par les inhibiteurs pyridinyl-imidazoles (SB202190 et SB203580), cause des changements importants du cycle cellulaire. En effet, la voie p38 $\alpha$ / $\beta$  est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire en agissant plutôt comme un modulateur négatif des points de contrôle du cycle cellulaire dont les phases G1/S, S, G2/M et intra-M (MacCorkle and Tan, 2005; Manke et al., 2005; Reinhardt et al., 2007; Reinhardt and Yaffe, 2009; Roovers and Assoian, 2000; Takenaka et al., 1998). Tel que prédit, les cellules HDLF non-stressées présentent indéniablement une abrogation des point de contrôle G2/M (**Figure Supp.I.5** en annexe) caractérisée par une phase G2 plus réduite accompagnée d'une augmentation de la phase G1. Ces résultats indiquent vraisemblablement une abrogation du point de contrôle G2/M et démontrent que l'activité p38 $\alpha$ / $\beta$ , évoquée par les UV, est nécessaire à l'arrêt en G2/M et non pour l'arrêt en G1, induit par les UV, dans les HDLF. D'ailleurs, il apparait, en plus, une augmentation de la phase S indiquant que p38 $\alpha$ / $\beta$  peut aussi être nécessaire au point de contrôle G1/S. L'analyse du cycle cellulaire présentée en **Figure Supp.I.5** montre que l'utilisation des inhibiteurs pyridinyl-imidazole entraîne, vraisemblablement, une abrogation de nombreux points de contrôle du cycle cellulaire.

En conclusion, les données du cycle cellulaire présentées en Annexe aux **Figures Supp. I.4 et I.5** indiquent que les voies MAPK sont des régulateurs critiques de la progression du cycle cellulaire. Leur inhibition conduit à des changements dramatiques du cycle cellulaire, qui peuvent sans aucun doute nuire à une analyse de la réparation NER si ces effets ne sont pas vérifiés et contrôlés. Quoiqu'il en soit, la méthode sensible d'analyse de la réparation basée sur la cytométrie en flux démontre une absence de tout effet de l'inhibition de l'activation MAPK sur la réparation des CPD et de 6-4PP dans les cellules humaines, malgré ses effets critiques sur la progression, la survie cellulaire et l'apoptose. Les résultats, présentés ici, réorientent ma vision mécanistique du rôle des voies MAPK dans la réparation NER malgré leur contradiction avec ce qui a déjà été rapporté antérieurement et récemment. Les résultats mettent en lumière les difficultés de disséquer avec exactitude le rôle des voies de signalisation de stress sur la réparation GGNER et montrent aussi l'importance et la nécessité de contrôler de nombreux processus cellulaires (au cours des temps de réparation étudiés) qui selon leur réponse pourraient conduire à une analyse erronée des résultats. Il est évident que le choix de la méthode de réparation est crucial dans ce type d'étude et fera toute la différence sur l'interprétation des données.

Une dérégulation de l'activité des voies MAPK peut être la cause de divers pathologies telles que le cancer, l'inflammation, les maladies cardiovasculaires. D'ailleurs, il apparaît que les voies MAPK JNK1/2 et p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$  jouent un rôle important dans ces processus pathologiques nécessitant l'expression de protéases et facteurs médiateurs nécessaires à l'invasion, la survie cellulaire et l'angiogenèse. Par exemple, JNK1/2 est hyperactive dans les cancers hépatiques alors l'activité p38 $\alpha$  semble, en revanche, diminuée (Elenitoba-Johnson et al., 2003). L'activité de cette voie est également augmentée dans les lymphomes et dans certains carcinomes (Yacoub et al., 2001). Les nœuds de communication entre les voies JNK1/2 et p38 $\alpha$ / $\beta$  semblent revêtir une importance particulière et pourraient être impliqués dans la réponse de nombreux mécanismes cellulaires (Engel et al., 2005; Hui et al., 2007a; Hui et al., 2007b). Leurs dérégulations pourraient participer entre autre à la promotion du cancer et à l'apparition de l'inflammation chronique (Wagner and Nebreda, 2009). Il est clair que les voies MAPK sont associées au développement ou la progression de maladies chroniques et génétiques comme la maladie de Crohn, qui est actuellement la cible d'essais cliniques testant

l'efficacité d'inhibiteurs des voies MAPK JNK1/2 et p38 $\alpha\beta$  (Goldstein et al., 2010; Van Den Blink et al., 2002). Des inhibiteurs spécifiques des voies MAPK peuvent donc s'avérer très utiles seuls ou combinés pour lutter contre le cancer, l'arthrite rhumatoïde (Sebolt-Leopold, 2004; Sebolt-Leopold and Herrera, 2004) et même les maladies neurodégénératives telles que l'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose amyotrophique latérale (Kim and Choi). Notamment, les inhibiteurs de la voie Raf/ERK tels que le BAY869766, XL518 et le Selubetinib font actuellement l'objet d'essais cliniques de phase II. Malheureusement, les essais avec le U0126, le PD98059 et le PD184352 ont été interrompus (Chappell et al., 2011). Tout comme ces derniers, les essais du SP600125 furent interrompus eux aussi mais en phase I, en raison de ses nombreux effets indésirables et ses problèmes de spécificité (Salh, 2007). Cependant d'autres inhibiteurs de la voie JNK1/2 montrent leur efficacité en essais cliniques tels que le CI-930 ou le Semapimod.

Enfin, de même que pour les inhibiteurs utilisés dans l'étude, les essais cliniques du SB202190 furent interrompus eux aussi. D'ailleurs, en raison de leur spécificité est des effets secondaires, les pyridinyl-imidazoles n'ont jamais dépassé la phase II (Gaestel et al., 2009). Néanmoins, d'autres inhibiteurs, comme le Losmamiopod et le Dilmapi mode sont en cours d'essais cliniques et semblent prometteurs (Anand et al., 2011; Lomas et al., 2012; Munoz and Ammit, 2010; Ostefeld et al., 2012).

En raison du vaste potentiel thérapeutique des inhibiteurs MAPK, notre étude revêt une plus grande importance en révélant qu'une inhibition des voies MAPK n'entraîne pas de défaut de la réparation NER et peuvent donc être utilisés ou administrés en essais clinique sans craindre, à priori, l'apparition chez les patients d'une photosensibilité accrue aux UV et l'induction de mutations à l'ADN causée par une altération de la réparation NER.

**Requirement for functional DNA polymerase  
eta in genome-wide repair of UV-induced DNA  
damage during S phase (Article 2)**

## **Article 2: Liste des co-auteurs**

Yannick Auclair

Jonathan Belisle

Santiago Costantino

Elliot Drobetsky

Auclair Yannick, Rouget Raphael, Belisle Jonathan M., Costantino Santiago and Drobetsky Elliot .A. (2010). Requirement for functional DNA polymerase eta in genome-wide repair of UV-induced DNA damage during S phase. *DNA Repair (Amst)*, **9**, 754-64

### **Article 2 présenté en Annexe pour consultation**

**Contributions :** Raphael Rouget, co-premier auteur de l'article 2, a réalisé la moitié des travaux présentés dans cet article, à part égale avec le Dr. Yannick Auclair. Les Dr. Santiago Costantino et Jonathan Belisle ont optimisé et aidé pour la méthode d'imagerie cellulaire en temps réel et à l'analyse des résultats présentés à la Figure 4C, avec la collaboration de Raphael Rouget. Le Dr. Elliot Drobetsky, Dr. Yannick Auclair et Raphael Rouget ont élaboré, analysé les expériences présentées et écrit l'article cité juste au dessus.

## **II. Requirement for functional DNA polymerase eta in genome-wide repair of UV-induced DNA damage during S phase**

### **II.1. Introduction**

Les cellules humaines sont constamment assujetties à l'induction de dommages à l'ADN produits de façon spontanée mais aussi par les agents de dommages exogènes dont les effets sont contrôlés par les systèmes de réparation de l'ADN et la réponse cellulaire à ces dommages. Si ces dommages ne sont pas réparés correctement, les conséquences de leur persistance peuvent être très différentes, délétères et diversifiées. Par exemple, dans le cas d'une induction aiguë de dommages à l'ADN, ces derniers vont persister à court terme, il se produira un arrêt du cycle cellulaire qui peut s'accompagner de la mort cellulaire, et ce, en raison du niveau élevé de dommages à l'ADN. Les effets à long terme de leur persistance résulteront inévitablement à l'induction de dommages irréversibles qui pourraient conduire à l'augmentation de l'instabilité génomique, qui est une des causes majeures de la tumorigenèse ou de la cancérogenèse. Autrement dit, ces lésions à l'ADN doivent être réparées pour empêcher toutes altérations ou perte de l'information génétique. Cette dualité pour la cellule de devoir choisir entre la survie ou assurer la transmission de l'information génétique intégrale devient très critique et peut favoriser l'oncogenèse. D'une manière plus générale, les mécanismes de blocage transitoire ou non de la transcription, d'inhibition de la réplication et de la ségrégation des chromosomes, et de tolérance des dommages, permettront majoritairement d'assister la cellule dans sa réponse et donner le temps nécessaire à l'action des systèmes de réparation. Les points de contrôles du cycle cellulaire répondent différemment aux dommages à l'ADN et ont, entre autre, pour vocation principale de stabiliser et de permettre le recrutement des différents systèmes assurant la réparation proprement dite. De plus, le choix du système de réparation dépendra principalement du type de dommages induits à l'ADN. Plus exactement, les cellules qui prolifèrent sont particulièrement vulnérables aux dommages à l'ADN puisque sous ses conditions, elles doivent assurer la duplication conforme et fidèle de leur ADN. Ces cellules auront donc un besoin actif de ces points de contrôles du

cycle cellulaire. Tel qu'abordé en introduction, les gènes en cours de transcription ou activement transcrits (représentant approximativement 2-5% du génome) voient leur transcription abrogée lorsque l'ARN polymérase II rencontre un dommage présent sur l'ADN. Ce blocage rend possible la réparation des dommages par les systèmes de réparation tel que le système NER couplé à la transcription, le TCNER. Tout comme la transcription, les dommages se produisant durant la réplication de l'ADN seront réparés par la cellule avec un blocage préalable de la réplication et de la progression cellulaire. Tous ces mécanismes ne peuvent se mettre en place que par une réponse et un contrôle précis et spécifiques assurés principalement par les points de contrôle du cycle cellulaire, qui font partie intégrante des systèmes de réparation. Ces points de contrôle permettent la coordination et la coopération avec les processus biochimiques essentiels et les machineries de la progression cellulaire afin de fournir la réponse la plus adéquate possible. Les acteurs protéiques des points de contrôles sont souvent recrutés au site du dommage à l'ADN et forment une structure de reconnaissance pour le signal d'activation de la réponse. Pendant la réplication de l'ADN, la fourche de réplication arrêtée par la présence de la lésion exhibe une grande portion d'ADN simple brin (ADNss), qui est une structure sensible, fragile avec une demi-vie relativement courte (Chan et al., 2012). Cette structure comme nous le verrons est essentielle à l'activation des points de contrôle et à la coordination avec les systèmes de réparation (MacDougall et al., 2007). Bien évidemment, tout défaut dans l'intégrité ou dans la signalisation de ces points de contrôle du cycle cellulaire résulterait en une augmentation critique de l'instabilité chromosomique ou dans la ségrégation des chromosomes. Il est donc primordial de réparer l'ADN dans chaque phase du cycle cellulaire afin d'éviter toutes pertes ou altérations de l'information génétique et ainsi empêcher le développement de pathologies associées à des altérations de l'intégrité de l'ADN (Kastan and Bartek, 2004; Painter and Young, 1980). La nature des systèmes de réparation de l'ADN qui seront mis à contribution pour réparer les dommages dépendra de la phase du cycle cellulaire dans laquelle ils sont sollicités mais aussi de la nature propre du dommage (Branzei and Foiani, 2008; Lehmann and Carr, 1994). La réparation des cassures double brins (DSB), générées principalement par les radiations ionisantes (IR) mais aussi par la persistance de structures ADN simple brins (ADNss), est le meilleur exemple où leur réparation nécessite au moins deux systèmes de réparation comme la recombinaison homologue (HRR) et la réparation par jointure non homologue (NHEJ). Ces deux systèmes

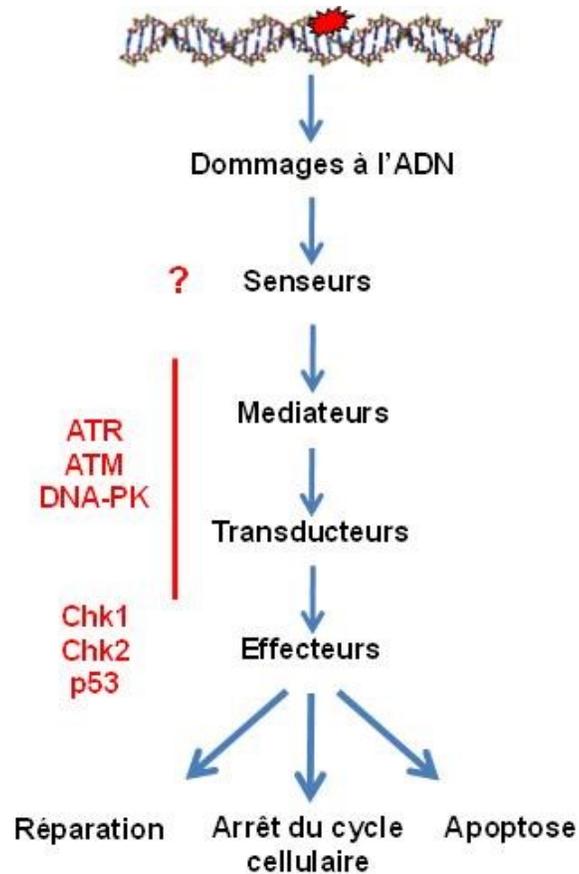
seront mis différemment à contribution en fonction de la progression du cycle cellulaire. Le système HRR semble plutôt nécessaire à la réparation des DSB en phase S et en phase G2 (lorsqu'une deuxième copie du gène est disponible), alors que le système NHEJ lui est plutôt nécessaire pour la réparation des dommages en phase G1 (lorsqu'une copie du gène est manquante). Néanmoins, ce n'est pas si simple, le NHEJ pourrait cependant agir dans toutes les phases de la progression cellulaire alors que le système HR semble avoir son activité beaucoup plus restreinte à la phase S et les phases G2/M (Couedel et al., 2004; Mao et al., 2008). Il semble donc que les systèmes NHEJ et HRR exercent leur activité en phase S de façon concertée dans le but de réparer l'ADN le plus efficacement possible et le moins délétère possible pour la cellule. De plus, le système MMR, responsable de la réparation des mésappariements de bases, exerce lui aussi sa fonction principalement en phase S, là où le plus de mésappariements sont susceptibles de se produire. Globalement, l'intervention spécifique et l'action concertée de plusieurs systèmes de réparation spécifique à la phase du cycle cellulaire permettent une meilleure réparation notamment en phase S, qui est certainement la phase la plus critique pour la cellule et l'intégrité de l'information génétique.

Ces modes de réparation de l'ADN dépendant de la progression du cycle cellulaire, doivent être orchestrés de façon adéquate et efficace pour assurer la réparation des dommages génotoxiques, donc il se pourrait aussi que les acteurs des systèmes de réparation de l'ADN interagissent avec les acteurs du cycle cellulaire afin d'exercer un contrôle précis et séquentiel de la réparation des dommages en fonction du cycle cellulaire, et plus particulièrement en phase S. D'ailleurs le trimer PCNA, facteur important du NER pour l'étape finale de resynthèse (*Gap filling*), joue également un rôle important au niveau de la fourche de réplication pendant la duplication semi-conservative de l'ADN et interagit avec le complexe de réplication, le réplisome (Li et al., 1994; Sancar, 1996; Waga and Stillman, 1994). Même si pour les DSB, l'action de plusieurs systèmes de réparation est nécessaire en phase S, en revanche, pour les dommages induits par les UV tels que les CPD et les 6-4PP, seul le système NER est capable de prendre en charge la réparation de ces lésions et des adduits dans toutes les phases du cycle cellulaire. Il est encore méconnu si le système NER possède une activité dépendante de la progression cellulaire. Il est évident que l'activité GGNER n'est pas restreinte qu'à la phase G1, sinon les UV auraient de conséquences beaucoup plus

dramatiques, mais semble nécessaire à toutes les phases du cycle cellulaire (Auclair et al., 2008; Mitchell et al., 1995).

Les cellules humaines ont développées une variété de points de contrôle de la progression cellulaire (qui sont d'ailleurs relativement bien conservés au cours de l'évolution), exerçant leur action, concertés ou non, sur les acteurs du cycle et permettent ainsi à la cellule d'assurer ses priorités vitales pour sa progression. Cependant, leur influence sur l'efficacité de la réparation GGNER des CPD et des 6-4PP reste encore très obscure et mal comprise. D'ailleurs le délai ou l'arrêt de la division cellulaire, suite à l'induction de dommage, a été rapporté et décrit bien avant le concept même de l'existence de point de contrôle du cycle cellulaire (Hartwell and Weinert, 1989). Comme il a déjà été mentionné en introduction de cette thèse, divers points de contrôle (comme les points de contrôle G1/S, de la phase S, de la phase G2 et de la phase M) exercent leur action sur le cycle cellulaire. Plus précisément, le point de contrôle de la phase S (ou intra-S), contrairement aux autres points de contrôle, n'empêche pas simplement la transition de la phase S aux phases G2/M, mais est capable de ralentir la progression dans la phase S. En effet, ce point de contrôle S peut ralentir la réplication de l'ADN en présence de dommages et semble plutôt exercer une activité dans la tolérance des dommages et dans l'adaptation cellulaire à gérer la présence de lésions génotoxiques pendant la phase de réplication de son génome. Ce point de contrôle S, revêt d'ailleurs une importance particulière pour les dommages induits par les UV puisque une augmentation des mutations induites par ces derniers a été corrélée avec la proportion de cellules en phase S (Kaufmann et al., 1987). L'activation et la capacité du point de contrôle S à gérer la présence de dommages à l'ADN seront capitales pour la lutte contre la fixation de mutations dans le génome et par conséquent contre le développement du cancer de la peau.

Le point de contrôle S peut être vu comme une cascade de signalisation conduisant au contrôle de l'intégrité de l'ADN en phase S. Suite à leur activation, les transducteurs transmettent les signaux à leurs cibles respectives contrôlant le cycle cellulaire. Très schématiquement, le point de contrôle S consiste simplement en une cascade d'évènements de phosphorylation conduisant à l'activation de la fonction ou de l'activité des acteurs du cycle cellulaire permettant de progresser, ou non, vers la phase G2.



**Schéma 11:** La Réponse UV d'origine nucléaire induite par les UV, dépendante des dommages à l'ADN Adapté de (Andersen et al., 2008).

### II.1.1 Activation du point de contrôle S après une exposition aux UV

La découverte de maladies humaines présentant des défaillances de ces systèmes a permis de mieux comprendre les mécanismes d'activation du point de contrôle S. Il a été, en effet, rapporté dans le passé, l'existence d'une maladie génétique, où les individus affectés présentent un risque élevé d'apparition de cancers et accompagnée d'une hypersensibilité aux IR. Le gène causal de cette maladie héréditaire, l'Ataxie-Télangiectasie (Ataxia-Telangiectasia, A-T syndrome) fut découvert en 1995 et code pour une protéine kinase, nommée ATM, de 350 kDa, exprimée de façon ubiquitaire, dont la dysfonction en dehors de l'hypersensibilité aux IR, conduit à une dégénérescence cérébelleuse accompagnée d'un

déficit immunitaire (Kaufmann et al., 1987; Painter and Young, 1980). Les cellules de ces patients présentent une importante inhibition de la réplication de l'ADN après irradiation IR par rapport à celle observée dans les cellules normales (Houldsworth and Lavin, 1980; Painter and Young, 1980). La découverte, la caractérisation et l'étude biochimique de la protéine ATM et de sa fonction ont permis de comprendre les événements moléculaires responsables de l'induction et la régulation du point de contrôle S. Il s'avère qu'ATM joue un rôle clé dans le point de contrôle S induit par les IR, qui fut d'ailleurs l'un des premiers points de contrôle induits par les dommages à être caractérisés. Les événements se produisant en phase S suite à l'induction de DSB sont par conséquent relativement documentés.

Brièvement, en phase S, dans le cas où les DSB ne rencontrent pas de fourche de réplication, ces cassures seront prises en charge par le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1), qui conduira à l'activation d'ATM. Cette activation au site de cassure, grâce à MRN enclenchent ensuite la phosphorylation de l'histone H2A à la sérine 139, dénommée aussi  $\gamma$ H2AX, qui à son tour va permettre le recrutement du complexe MDC1, et aussi de ATM-MRN créant ainsi une amplification du signal, qui sera ensuite relayé par les cibles en aval de ATM comme la kinase Chk2. Il se peut aussi que les cassures DSB en phase S, rencontrent une fourche de réplication, qui par blocage va générer une portion d'ADN simple brin, ADNss. Cette portion ADNss causée par découplage de processivité entre les ADN polymérase du réplisome de la fourche de réplication sera primordiale pour l'activation du point de contrôle. Cet ADNss néoformé et rapidement recouvert de la protéine RPA, et sert de signal d'activation du point de contrôle S pour la jumelle de la kinase ATM, la protéine kinase ATR (*Ataxia- Telangiectasia and Rad3-related kinase*). Cette activation, qui sera détaillée plus loin, nécessitera d'autres complexes comme le complexe 9.1.1 (*RAD9-RAD1-HUS1*)-Rad17-RFC. De plus l'action du complexe MRN peut générer lui aussi une courte portion d'ADNss aux extrémités du DSB et ainsi activer ATR (Branzei and Foiani, 2008; Jazayeri et al., 2006) Globalement et de façon simplifiée, les DSB qui ne sont pas réparés en phase G1 entraîneront un blocage de la fourche de réplication et/ou un effondrement de cette dernière (*replication fork collapse*), qui entrainera l'activation de ATM (via MRN) et de ATR (via le complexe 9.1.1).

L'observation de l'inhibition de la réplication après une exposition aux UV démontre l'existence d'un point de contrôle S en réponse aux UV (Rude and Friedberg, 1977). Plus

précisément, il a été démontré que la présence de fourche de réplication est un élément clé dans l'établissement de ce point de contrôle (Tercero et al., 2003). De façon plus générale, toute induction de dommages en phase S conduira à un arrêt de la fourche de réplication. Ce phénomène désigné souvent de «stress réplcatif», conduira à l'activation du point de contrôle S par activation des senseurs-médiateurs ATM et ATR de la réponse nucléaire aux dommages à l'ADN.

Les kinases PI3KK ATM et ATR: Les kinases ATM et ATR appartiennent à la famille PI3KK (*PhosphoInositide 3-Kinase-related protein Kinases*) et sont des senseurs et les médiateurs essentiels de la réponse nucléaire aux UV. Ces PI3KK ont été découvertes grâce aux syndromes familiaux d'Ataxie-Télangiectasie et de Seckel (faisant référence à présent au syndrome ATR-Seckel) (Abraham, 2001; O'Driscoll et al., 2003; Savitsky et al., 1995) et sont causés par la perte fonctionnelle de ATM (formée de 3056 résidus) ou de la kinase ATR (formée de 2044 résidus) respectivement. Ces 2 kinases, fonctionnellement et biochimiquement similaires, pourraient exister sous forme de dimères actifs, activés par autophosphorylation intramoléculaire, conduisant à la dissociation de la forme dimérique (Bakkenist and Kastan, 2003). Une fois activées ces PI3KK ont la particularité de phosphoryler les sites S/TQ présents sur leurs cibles spécifiques. Un criblage à grande échelle en réponse aux IR a révélé plus de 700 cibles cellulaires (Matsuoka et al., 2007). Parmi ce grand nombre de cibles, qui concerne une multitude de fonctions, il y a des cibles impliquées dans la réplication, la réparation de l'ADN, les points de contrôle du fuseau mitotique et l'apoptose. Toutes participent à des processus majeurs et indiquent que ces kinases ont des rôles essentiels pour la cellule. D'ailleurs, les souris ATR déficientes ne sont pas viables (Brown and Baltimore, 2000). Chez l'homme, les mutations ATM, retrouvées dans le syndrome A-T, prédisposent aux cancers et aux maladies neurologiques. Les mutations ATR sont en revanche beaucoup rares et ne sont viables qu'en raison de l'hétérozygotie ou de l'hypomorphie de cette déficience ATR (ATR-Seckel), (O'Driscoll et al., 2007; O'Driscoll and Jeggo, 2003). Toutes ces pathologies, corrélées avec celles de souris, indiquent clairement qu'ATR exerce des fonctions plus essentielles contrairement qu'ATM. D'ailleurs, il est rapporté que les kinases ATM et ATR répondent différemment aux radiations ionisantes et aux UVC. Plus précisément, il fut montré que l'induction de dommages à l'ADN entraîne une

redistribution nucléaire d'ATR, d'une localisation de diffuse en foyer (ou *foci*), alors que ATM reste diffuse dans le noyau après une exposition aux IR et UV. Schématiquement, ATM devient catalytiquement active suite à l'induction de dommages alors qu'ATR, constitutivement active, se redistribue aux sites de dommages à l'ADN (Abraham, 2001). En fait, ATR est activé par toute une variété de dommages à l'ADN dont les pontages intercaténaux, les adduits mais aussi par les DSB tel que mentionné juste avant. La fonction et l'activité ATM semblent, en revanche, plus restreintes à l'induction de DSB, qui activent aussi de façon concomitante ATR. ATM est nécessaire à la réparation des fourches de réplication mais aussi pour empêcher l'entrée en mitose des DSB qui auraient des conséquences désastreuses sur la ségrégation des chromosomes.

Génériquement, il est considéré que les IR activent la voie de signalisation ATM/Chk2 alors que les UV et le stress répliatif, activent plutôt la voie ATR/Chk1 (Helt et al., 2005; Stiff et al., 2006; Unsal-Kacmaz et al., 2002; Ward et al., 2004). Il est bien évident que cette vision un peu simpliste concernant la régulation du point de contrôle S induit par les UV, ne reflète pas vraiment la réalité car ces kinases ont des cibles chevauchantes et redondantes. D'ailleurs NBS1 réalise un lien entre ATM et ATR (Olson et al., 2007). Il est donc plus approprié de penser que les kinases ATM et ATR coopèrent après l'induction de dommages à l'ADN avec un rôle plus restreint à la phase S pour cette dernière (Stiff et al., 2005; Wang et al., 2006). Une des cibles les plus communes pour ATM et ATR, aussi l'une des mieux caractérisées, est certainement le suppresseur de tumeur p53. En effet, ATM et ATR phosphorylent p53 sur la sérine 15, de façon drastique après les IR et de façon beaucoup plus mitigée après une exposition aux UV. Cet événement de phosphorylation serait nécessaire à la stabilisation de p53 (Banin et al., 1998; Shieh et al., 1997), et s'intègre dans une réponse cellulaire globale aux agents de dommages à l'ADN et plus particulièrement à la réponse UV.

## II.1.2 Mécanismes d'activation du point de contrôle en phase S induits par les UV

Tel que précisé précédemment, les longs brins d'ADNss jouent un rôle très important pour l'activation d'ATR. Ces structures d'ADNss sont des intermédiaires communément retrouvés pendant la réplication de l'ADN mais aussi pendant la transcription, la réparation de l'ADN et dans la maintenance de l'intégrité des télomères. Si ces structures très fragiles ne sont pas stabilisées rapidement ou persistent trop longtemps, elles entraîneront la génération de DSB. Ces structures représentent donc une menace importante pour l'intégrité de l'ADN. En particulier, lorsque des cellules en phase S sont exposées aux UV ou lorsque des dommages induits en phase G1/G0 persistent et entrent dans la phase S, les fourches de réplication vont s'arrêter immédiatement et générer de longues structures d'ADNss qui seront rapidement recouvertes des hétérotrimères RPA (Costanzo et al., 2003). RPA est un trimère composé de RPA1 (70 kDa), RPA2 (32 kDa) et RPA3 (14 kDa). Chacun de ses membres peut être substitué fonctionnellement par une forme atypique de RPA (aRPA) (Kemp et al., 2009). Ces trimères liés à l'ADNss seraient les signaux responsables de l'activation de la kinase ATR (Costanzo et al., 2003), mais RPA ne semble toutefois pas absolument nécessaire à l'activité de la voie ATR. L'interaction de RPA avec ATRIP (*ATR-Interacting Protein*) permettra ensuite le recrutement de TopBP1 et des autres facteurs de signalisation du point de contrôle en phase S. Schématiquement et séquentiellement, immédiatement après la formation des structures ADNss-RPA-ATR, le complexe 9.1.1 se lie à l'ADN ainsi que le complexe ATRIP-ATR, ce que permettra le recrutement de TopBP1 et l'activation d'ATR, ainsi que sa signalisation subséquente (Burrows and Elledge, 2008; Kim et al., 2005). Néanmoins, il a été rapporté que la reconstitution *in vitro* des complexes ADNss-RPA serait capable d'activer la signalisation ATR et induire la phosphorylation de Chk1. Dans ce système reconstitué, la phosphorylation de Chk1 par ATR serait dépendante des complexes TopBP1 et RPA-ADNss (Choi et al., 2010) (voir **Schéma 11**).

La signalisation de la voie ATR: De façon générale, la voie ATR activée par le stress répliatif induit par les UV a pour conséquence, (i) la stabilisation du réplisome au niveau des fourches de réplication, (ii) le ralentissement de la réplication, (iii) la prévention de nouveau départ de réplication (déclenchement des origines de réplication) et, (iv) la régulation transcriptionnelle

des gènes en réponse aux dommages à l'ADN. Une des cibles clés de la signalisation ATM/ATR sont les kinases Chk1 et Chk2. Plus exactement, la kinase Chk1 sera cruciale pour la réponse des points de contrôle de la phase S mais aussi plus globalement, essentielle dans la réponse cellulaire aux UV. D'ailleurs la liste des substrats ATR dans la réponse aux dommages s'allonge d'années en années (Matsuoka et al., 2007; Stokes et al., 2007b). Par exemple, Chk1 permet de relayer les signaux du site du dommage à l'ensemble du noyau par son activation par ATR, détectée par phosphorylation de sites S(T)/Q, les sites sérine 317 et sérine 345 (Liu et al., 2000b). Une fois phosphorylée, Chk1 se détache ensuite de chromatine pour phosphoryler toute une variété de substrats. Cependant, pour être active, la kinase Chk1 a besoin d'interagir avec Claspin (protéine adaptatrice entre ATR et Chk1) (Burrows and Elledge, 2008) et peut aussi être activée par Tim/Tipin (*Timeless interacting protein*), (Unsal-Kacmaz et al., 2007). La phosphorylation de Chk1, est un bon rapporteur de l'activation du point de contrôle S induit par les UV, et sa phosphorylation par ATR lui permet d'exercer un contrôle précis sur la progression du cycle cellulaire. Ses cibles majeures sont notamment les phosphatases CDC25A, B et C (Sanchez et al., 1997), qui exercent un contrôle précis sur les transitions du cycle cellulaire par inhibition des kinases CDK.

Tel que mentionné précédemment, ATR possède un certain nombre de substrats au niveau de la fourche de réplication, dans le réplisome comme le complexe RFC, les protéines RPA1, RPA2, MCM(2-7), MCM10 et aussi, comme nous le verrons plus loin, les ADN polymérases translésionnelles (Cimprich and Cortez, 2008; Cortez et al., 2004; Matsuoka et al., 2007). Ces évènements de phosphorylation au niveau de la fourche de réplication contribuent au ralentissement, la tolérance des dommages et la reprise de la réplication au niveau des fourches. Ce mécanisme de reprise pourrait toutefois impliquer la phosphorylation MCM2 et l'activité PLX1 (*Polo-like kinase 1*) (Trenz et al., 2008). Il existe cependant de nombreuses redondances fonctionnelles et un certain nombre de points de communication entre la signalisation ATM et ATR. Ces deux dernières présentent même une certaine interdépendance au niveau fonctionnel et de leur activation. Par exemple, ATM est principalement nécessaire pour la phosphorylation de Chk2, mais ce dernier peut aussi être phosphorylé par ATR en réponse aux dommages à l'ADN, tout comme p53 tel que mentionné plutôt (Ward et al., 2004). ATM est aussi capable de phosphoryler TopBP1 et ainsi de stimuler l'activation

d'ATR. Les activations des kinases Chk1 et Chk2 par ATR et ATM, pourraient finalement refléter une conversion des portions ADNss en DSB (Cimprich and Cortez, 2008). Il est clair que ATR et ATM coopèrent, ensemble, pour réguler le point de contrôle S et que leur activité est nécessaire à l'homéostasie de l'ADN en réponse aux UV en phase S (Stiff et al., 2006). Le ralentissement de la progression en phase S et donc de la réplication cellulaire consiste à permettre la réparation des dommages potentiellement létaux. Le blocage de fourches de réplication au niveau des dommages peut persister afin de permettre à la cellule de gérer la réparation des dommages et leur présence sur l'ADN en phase S. La cellule a, en effet, développée certains mécanismes qui vont lui permettre de tolérer les dommages de façon temporaire jusqu'à leur réparation par le système que sera le plus approprié. La tolérance des dommages est un mécanisme qui diffère des systèmes de réparation classiques de l'ADN car au lieu de restaurer l'intégrité de l'ADN fidèlement, la lésion est tolérée et par conséquent toujours présente sur l'ADN après l'action de ce mécanisme. Finalement, cette tolérance des dommages, en phase S, a surtout pour vocation de promouvoir la survie cellulaire et la terminaison de la réplication le plus fidèlement sans altérations de la structure de l'ADN.

### II.1.3 La tolérance des dommages et la synthèse translésionnelle de l'ADN

En absence de mécanismes de tolérance des dommages, la cellule s'expose à des risques élevés d'effondrements des fourches de réplication et d'aberrations chromosomiques et de mort cellulaire si une solution n'est pas trouvée rapidement. Cette tolérance face aux dommages à l'ADN en phase S est basée sur l'habilité de ces cellules de répliquer leur génome malgré la présence de dommages. C'est pourquoi ces mécanismes de tolérance sont souvent la source de l'induction de mutations et peuvent être donc vus comme des voies promutagènes dans certains contextes comme nous le verrons plus loin. De façon assez simpliste, il existe différents mécanismes de tolérance des dommages à l'ADN. Il y a la synthèse translésionnelle (qui peut être fidèle (*error free*) ou mutagène (*error prone*)), la régression de la fourche de réplication (*error free*) et la recombinaison homologue (*error free*) (Sale et al., 2012), voir **Schéma 12**.

Les ADN polymérase répliquatives, qui assurent la réplication de l'ADN avec une haute-fidélité, sont cependant incapables d'assurer la réplication lorsqu'elle rencontre la lésion, en raison de la non-tolérance de leur site actif pour le dommage. Les cellules de mammifères, pour pallier à ces blocages des fourches de réplication, auront recours principalement au mécanisme de synthèse translésionnelle. Ce mécanisme, consiste simplement à insérer une base sur le brin complémentaire en face du dommage, dont l'exécution est assurée par les ADN polymérase spécialisées, les ADN polymérase translésionnelles. Ces dernières ont une fidélité de réplication plus faible que les ADN polymérase répliquatives, pour tolérer les dommages. De plus ces ADN polymérase spécialisées se dissocient de la fourche après avoir insérées quelques bases, car sinon un grand nombre d'erreurs seraient générées, et doivent donc être finement contrôlées. La plupart des ADN polymérase translésionnelles appartiennent à la famille Y des ADN polymérase, qui comptent chez l'humain 4 membres Y ( $\eta$ ,  $\kappa$ ,  $\iota$  et Rev1). Plus exactement, les ADN polymérase translésionnelles connues pour leur activité translésionnelle sont au nombre de 6 ( $\eta$ ,  $\kappa$ ,  $\iota$ , Rev1  $\zeta$  et  $\beta$ ), auxquelles sont ajoutés 5 polymérase dont la fonction est plus restreinte et spécialisée ( $\gamma$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\theta$  et  $\nu$ ), contre seulement 3 ADN polymérase répliquatives ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Les ADN polymérase humaines sont listées dans le **Tableau 2** (Lehmann et al., 2007; Moon et al., 2007; Waters et al., 2009).

L'importance de la fonction des ADN polymérase translésionnelles a été observée depuis longtemps chez les patients atteints d'un syndrome de prédisposition aux cancers de la peau qui présente des similarités mais aussi des différences phénotypiques avec le syndrome de Xérodémie Pigmentaire (XP, *xeroderma pigmentosum*).

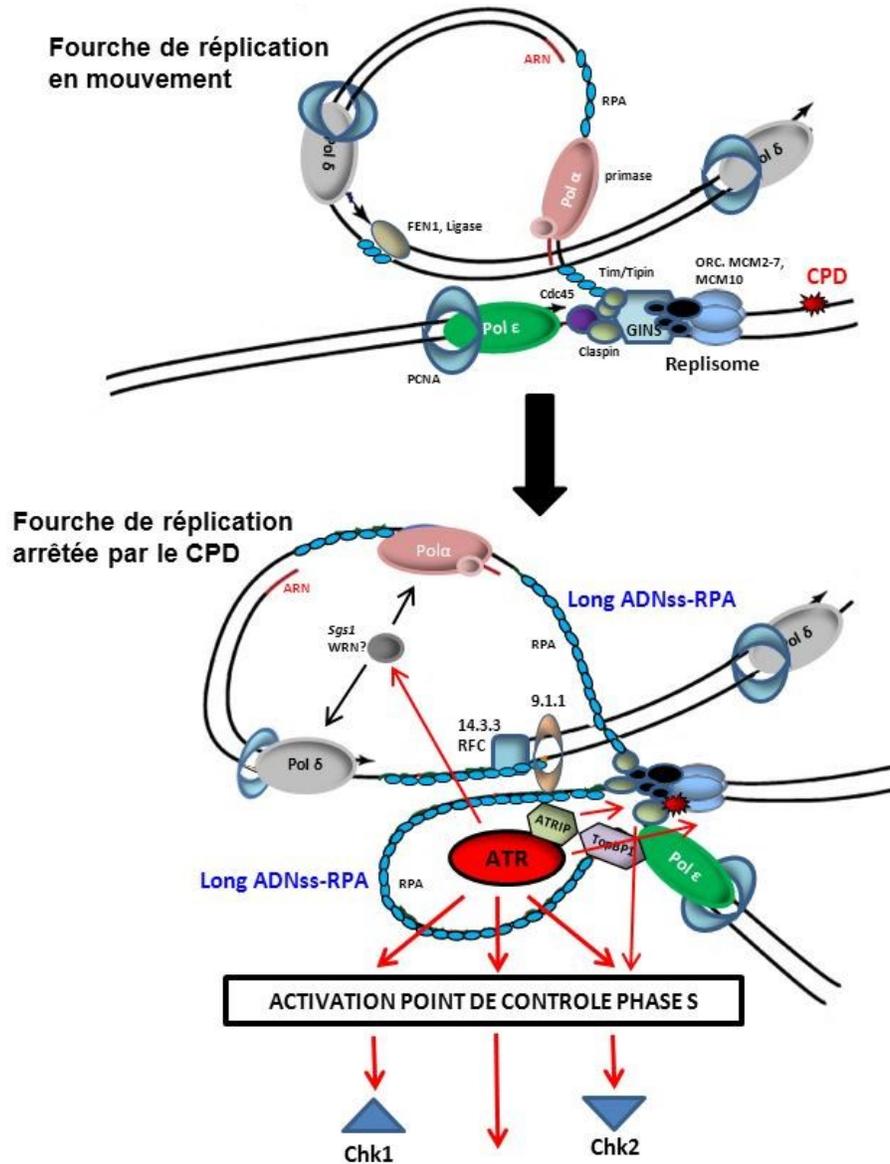
**Tableau 2:** Les ADN polymérase humaines

<i>ADN Polymérase</i>	<i>Famille</i>	<i>Fonction</i>	<i>Taille (kDa)</i>
<i>Répliquatives</i>			
<i>Pol α</i>	<i>B</i>	Réplication, priming	166
<i>Pol δ</i>	<i>B</i>	Réplication, NER, MMR	124
<i>Pol ε</i>	<i>B</i>	Réplication, NER, MMR	262
<i>Translésionnelles</i>			
<i>Pol ζ</i>	<i>B</i>	Bypass et mutagenèse	353
<i>REV1</i>	<i>Y</i>	Ancrage pour les polymérase	138
<i>Pol η</i>	<i>Y</i>	Bypass des dommages UV, CPD	78
<i>Pol ι</i>	<i>Y</i>	Sert de backup pour le bypass CPD	80
<i>Pol κ</i>	<i>Y</i>	NER et bypass des adduits à l'ADN	99
<i>Pol γ</i>	<i>A</i>	Réplication mitochondriale et réparation	140
<i>Pol β</i>	<i>X</i>	BER et recombinaison méiotique	38
<i>Pol λ</i>	<i>X</i>	Recombinaison V(D)J, BER?	63
<i>Pol μ</i>	<i>X</i>	Recombinaison V(D)J, BER?	55
<i>Pol θ</i>	<i>A</i>	Défense contre les IR	290
<i>Pol ν</i>	<i>A</i>	Réparation des liaisons intercaténares	100
<i>TdT</i>	<i>X</i>	Diversité des immunoglobulines	58

Adapté de (Lange et al., 2011)

### II.1.3.1 Le syndrome Variant de Xérodémie Pigmentaire (XP-V)

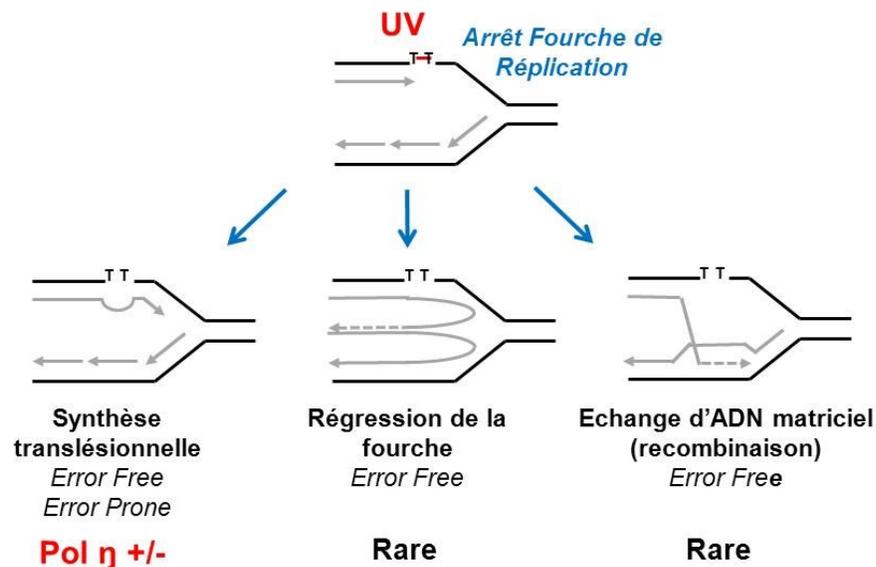
Le syndrome XP fut décrit pour la première fois en 1874 par Kaposi mais le syndrome XP-V, d'origine autosomique récessif, fut seulement décrit dans les années 70 par Jung (Jung, 1970). Les patients atteints de syndrome XP-V présentent notamment une induction de cancers de la peau 1000 fois supérieure à celle des individus normaux. Les patients XP-V ne présentent aucuns symptômes neurologiques et montrent plus particulièrement une prépondérance des carcinomes des cellules basales (BCC) et des cellules squameuses (SCC) (Cleaver, 2000). Ces patients représentent aujourd'hui 20 % des individus affectés d'un syndrome XP.



**Schéma 12:** Représentation schématique de l'activation de la kinase ATR induite par la génération d'ADNss-RPA, provoquée par l'arrêt de la fourche de réplication au niveau du dommage.

En l'absence de dommage, les complexes de réplication (réplisome) (MCM, ORC, Tim/Tipin, cdc45) progresse au niveau de la fourche de réplication où la synthèse du brin complémentaire ou brin leader (*leading strand*) est assurée par Pol ε et la synthèse du brin complémentaire ou brin retard (*lagging strand*) dans laquelle Pol α, porteuse de l'activité primase, assure la synthèse d'ARN amorce pour la synthèse des fragments d'Okazaki réalisée par Pol δ. Lorsque la fourche rencontre un CPD, il se produit un découplage de processivité des ADN polymérase de la fourche, qui générera lui-même, de longues portions ADN simple brin (ADNss), qui seront rapidement recouvertes par RPA. Ces structures ADNss-RPA serviront de signal d'activation de la kinase ATR par recrutement ATRIP/TopBP1, qui stimulera à son tour l'activation ATR au niveau de la fourche de réplication pour déclencher le point de contrôle en phase S (permettant le ralentissement de la progression en phase S, la stabilisation du réplisome et stimulera la résolution de la fourche bloquée). Adapté de (Friedel et al., 2009).

Ils furent dénommés « XP variant » car pendant longtemps, aucun défaut du NER n'a été constaté chez ces patients (Cleaver et al., 1980). En effet, une caractéristique importante des patients XP-V est leur capacité à réparer normalement les dommages induits par les UV dont les CPD et 6-4PP (Ahmed and Setlow, 1979; Cleaver, 1972; Mitchell et al., 1987). Autrement dit, les cellules XP-V montrent une susceptibilité au cancer de la peau avec une réparation NER qui semble normale. Les survies des cellules de patients XP-V ne sont que très légèrement diminuées par rapport aux cellules normales et contrastent avec les faibles survies observées dans les cellules XP-A, XP-D et XP-G (Chapnick et al. 2011). Toutefois, ce faible effet des UV sur la survie es cellules XP-V est exacerbé en présence de caféine (Arlett et al., 1975; Broughton et al., 2002). De plus, les cellules de patients XP-V ne présentent pas toutes la même sensibilité aux UV, ce qui reflète peut être l'hétérogénéité de leur phénotype clinique. Toujours, contrairement aux autres syndromes XP, le syndrome XP-V se manifeste plus tardivement, vers la trentaine en générale, et montrent une augmentation des mutations à l'ADN après une exposition UV. Cependant très peu de patients XP-V développent des altérations neurologiques, qui sont bien souvent observées pour les autres syndromes XP.



**Schéma 13:** Les mécanismes cellulaires de tolérance des dommages induits par les UV en phase S au niveau de la fourche de réplication. Adapté de (Andersen et al., 2008)

Pendant longtemps, le gène causal de la maladie XP-V est resté inconnu. Cependant, l'incapacité des cellules XP-V à répliquer l'ADN endommagé a permis de suspecter une défaillance probable dans la synthèse translésionnelle. En effet, ce n'est que bien plus tard que le gène causal fut identifié, par complémentation, comme étant un homologue de la protéine de levure *Rad30* et codant une ADN polymérase spécialisée. Ce gène, localisé sur le chromosome 6 (6p21.1-6p12) fut montré muté chez tous les cas XP-V avérés et fut ensuite dénommé POLH, Pol  $\eta$  ou hRad30 (Johnson et al., 1999; Masutani et al., 1999a; Masutani et al., 1999b). Ce gène, qui est constitué de 11 exons où l'exon 1 n'est pas traduit, code Pol  $\eta$ , qui est une protéine de 713 résidus, d'une masse approximative de 78 kDa (Yuasa et al., 2000). Cette ADN polymérase Pol  $\eta$  est inactive ou non fonctionnelle chez les patients XP-V. D'ailleurs les mutations du gène hRad30 retrouvées chez ces patients peuvent être essentiellement classées en 3 groupes dont (i) au moins un allèle possède une mutation faux-sens (mutation ponctuelle qui induit un changement d'acide-aminé, *missense*), (ii) au moins un allèle code pour une forme tronquée par mutation non-sens, et enfin, (iii) les 2 allèles codent pour une forme tronquée présentant une taille d'au moins 420 résidus (Broughton et al., 2002) au lieu des 713 résidus attendus. Globalement, toutes ces mutations retrouvées consistent en des mutations de sites donneurs d'épissage des précurseurs ARNm, de mutations faux-sens, des délétions dans le domaine catalytique de Pol  $\eta$  et enfin des mutations non-sens. La plupart des messagers retrouvés ne sont pas détectables à l'exception de patients qui possèdent des mutations faux-sens, et qui bien souvent présentent une très faible expression de Pol  $\eta$ . D'ailleurs, il se pourrait qu'un mécanisme de contrôle qualité des messagers ARNm (*non-sens mediated messenger decay*) soit impliqué comme il fut déjà rapporté chez les patients XP-C ayant un codon stop prématuré (Broughton et al., 2002; Inui et al., 2008; Tanioka et al., 2007). Néanmoins, toutes les type de cellules XP-V étudiées ne montrent clairement l'existence d'un tel mécanisme mais au contraire, l'absence d'expression protéique de Pol  $\eta$  par immunobuvardage, et non des messagers, indiquerait plutôt une protéolyse des formes produites Pol  $\eta$  tronquées par un mécanisme de dégradation protéique par ubiquitination via le protéasome (Bienko et al., 2005). Aucune corrélation forte entre les mutations POLH et la sévérité clinique (ou l'hétérogénéité phénotypique), n'a été retrouvée chez les patients XP-V. Voyons plutôt la fonction et le rôle de l'ADN polymérase translésionnelle Pol  $\eta$  dans le franchissement des dommages à l'ADN induit par les UV au niveau des fourches de répllication.

### II.1.3.2 L'ADN polymérase $\eta$ (Pol $\eta$ ) et la synthèse translésionnelle induite par les UV

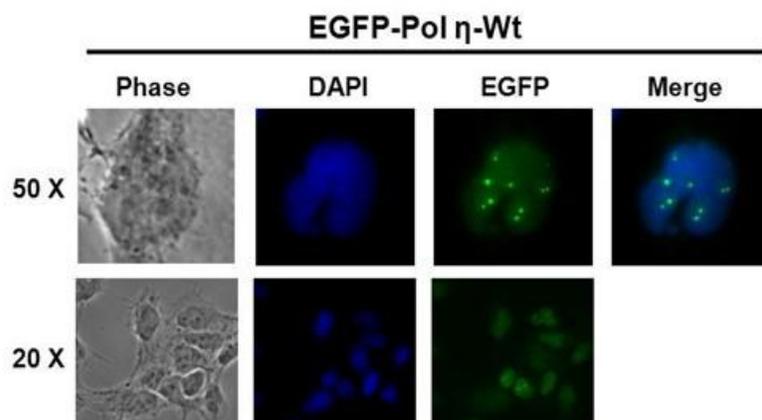
Les ADN polymérases spécialisées pour la synthèse translésionnelle sont moins fidèles que les ADN polymérases réplicatives. L'une de leurs caractéristiques principales est qu'elles ne possèdent pas d'activité de relecture (*proofreading*) 3'-5', ce qui les rend moins fidèles. Par exemple, pour un ADN intact, ces polymérases montrent une fidélité réduite d'au moins 100 fois (Kunkel, 2004; Waters et al., 2009). Toujours sur un ADN intact, ces polymérases peuvent introduire 1 erreur toutes les 10 à 10 000 paires de bases (Waters et al., 2009). En raison de cette faible fidélité, ces ADN polymérases spécialisées ont souvent été vues comme des ADN polymérases promotrices d'erreurs ou de mutations, ce qui fut toutefois revisité et remis en perspective par certaines études qui démontrèrent que l'évènement de franchissement de la lésion au niveau de la fourche (ou *bypass*) est, en fait, effectué *in vivo* séquentiellement par plusieurs ADN polymérases translésionnelles et ainsi permettre l'utilisation de certaines ADN polymérases spécifiques pour le franchissement spécifique de certaines lésions. Ce mécanisme est donc fidèle pour la synthèse translésionnelle des dommages induits par les UV assuré par Pol  $\eta$  (Moon et al., 2007; Shachar et al., 2009; Waters et al., 2009). En effet, il s'est avéré plus tard que la fidélité dans le *bypass* de certaines lésions par certaines ADN polymérases reste inchangée ou meilleure que leur fidélité observée sur un ADN intacte (Shachar et al., 2009; Waters et al., 2009). De plus comme nous allons le voir, le franchissement des lésions, effectué par certaines ADN polymérases translésionnelles, sera plutôt *error-prone* ou *error-free* en fonction de l'ADN polymérase spécialisée.

L'ADN polymérase  $\eta$ , appartient à la famille Y des ADN polymérases. Les membres de cette famille possèdent un domaine catalytique bien conservé entre elles et proche de l'extrémité N-terminale. Les extrémités C-terminales, présentent en revanche moins d'homologies et sont moins bien conservées. Cette partie est d'ailleurs nécessaire à leur localisation cellulaire et à leur fonction au niveau de la fourche de réplication arrêtée (Kannouche et al., 2001). Pol  $\eta$  a la particularité d'être capable de franchir les CPD au niveau de la fourche de réplication sans y introduire d'erreurs ou alors que très rarement (McCulloch et al., 2004). Son rôle central dans maladie XP-V et par son absence, de toute évidence

délétère pour l'individu (syndrome XP-V), indiquent son importance dans le franchissement des dommages aux UV. L'arrêt prolongé des fourches de réplication, suite à l'induction de dommages UV, observé dans les cellules XP-V, n'est pas un arrêt infini des fourches de réplication mais plutôt un ralentissement très important de la progression en phase S. La réplication est tout de même capable de reprendre son cours dans les cellules XP-V. En effet, Pol  $\eta$  pourrait être remplacée par l'ADN polymérase translésionnelle iota (Pol  $\iota$ ) dans les cellules XP-V. Pol  $\iota$ , contrairement à Pol  $\eta$ , celle-ci exerce une activité de synthèse translésionnelle promotrice d'erreurs (*error-prone*) et pourrait être responsable de l'augmentation importante des mutations induite par les UV (Lehmann et al., 2007).

Contre toutes attentes, même si Pol  $\eta$  est capable de franchir les CPD efficacement, Pol  $\eta$  est incapable de franchir les 6-4PP (Johnson et al., 2001; Yu et al., 2001). De plus, l'absence de Pol  $\eta$  n'entraîne pas d'augmentation des mutations par la présence de 6-4PP. En effet, le *bypass* de cette lésion serait plutôt assuré par l'ADN polymérase translésionnelle  $\zeta$  (Pol  $\zeta$  et REV3) chez la levure (Johnson et al., 2001; Waters et al., 2009) et aussi chez l'humain (Shachar et al., 2009). Cette grande différence à franchir ces lésions communes, induites par les UV, génère un spectre de mutations et démontre une voie plutôt *error prone* dans le franchissement des CPD en absence de Pol  $\eta$  (McGregor et al., 1999; Shachar et al., 2009). En son absence, une partie des CPD peuvent générer des DSB, par persistance des fourches de réplication et la résolution lente du blocage des fourches au niveau de ces lésions (Alt et al., 2007; Limoli et al., 2000; Shachar et al., 2009). Néanmoins, en dehors des CPD, Pol  $\eta$  est capable de franchir un grand nombre de lésions telles que les 8oxoG, les thymines glycols (TG), les O-méthyl guanine (O<sup>6</sup>MG) ainsi que les adduits dérivés du cisplatine et l'oxiplatine *in vitro* (Waters et al., 2009). De plus Pol  $\eta$  est capable de moduler la sensibilité cellulaire aux agents chimiothérapeutiques comme la gemcitabine (difluoro-deoxycytidine, dFdC) et la cytosarabine ( $\beta$ -D-arabinofuranosyl-cytosine, AraC). Pol  $\eta$  pourrait donc être impliquée dans la résistance, observée en clinique, contre certains agents chimiothérapeutiques. Cependant sa capacité de *bypass in vitro* pourrait ne pas toujours refléter son implication *in vivo*. En effet, dans les cellules humaines, l'absence de Pol  $\eta$  n'exerce aucun effet sur la capacité des cellules à franchir les 8oxoG (Avkin and Livneh, 2002). D'ailleurs, il a déjà été rapporté que Pol  $\eta$  pourrait participer à d'autres événements que ceux de synthèse translésionnelle comme le mécanisme de recombinaison (Hirota et al., 2010; Rattray and Strathern, 2005).

Quoiqu'il en soit, la fonction primaire de Pol  $\eta$  est de réduire la mutagenèse et la carcinogénèse *in vivo*. Il est observé que celle-ci se recrute en foyers (*foci*) aux fourches de réplication pendant la phase S, qui deviennent plus nombreux suite à l'induction de dommages (Kannouche et al., 2001). Ces foyers sont souvent considérés comme des sites de synthèse translésionnelle mais Pol  $\eta$  peut aussi former des foyers en phase G1 du cycle cellulaire après UV. Ces observations suggèrent que la fonction biologique de Pol  $\eta$  n'est peut-être pas uniquement restreinte à la phase S (Akagi et al., 2009; Olson et al., 2007). Pol  $\eta$  peut aussi former des foyers en phase S dans des cellules non endommagées, mais à plus faible fréquence. Cette capacité de former des foyers en phase G1 indique que Pol  $\eta$  pourrait donc se localiser à proximité des fourches de réplication en cas de nécessité pour la synthèse translésionnelle (voir **Schéma 14**). D'ailleurs, sa localisation aux foyers n'implique pas toujours une activité de bypass.



**Schéma 14:** Exemple de foyers nucléaires (*nuclear foci*) formés par EGFP-Pol  $\eta$ -Wt dans les cellules XP-V (XP30ROsv) complémentées et non-exposées aux UV.

La fusion EGFP-Pol  $\eta$ -Wt est stablement exprimée dans les fibroblastes (transformés avec le virus SV40) de patient XP-V (XP30ROsv). Phase, indique le contraste de phase; DAPI montre le noyau (par marquage de l'ADN); EGFP, montre la localisation nucléaire spécifique de EGFP-Pol  $\eta$ -Wt (EGFP), par autofluorescence et exhibe parfois une formation de foyers nucléaires; Merge, indique la superposition du marquage ADN (DAPI) et de l'autofluorescence EGFP.

### II.1.3.3 Les autres ADN polymérase de la synthèse translésionnelle

L'ADN polymérase iota (Pol  $\iota$ , *hRad30b*, *POLI*): Contrairement à Pol  $\eta$ , aucune maladie humaine n'ont été directement causée par une déficience de la fonction de Pol  $\iota$ , et son rôle est beaucoup moins bien défini. Pol  $\iota$  n'existe pas chez la levure, c'est pourquoi son rôle a souvent été investigué chez les souris déficientes en Pol  $\iota$  (McDonald et al., 2003). Ces dernières n'ont en effet, aucun phénotype particulier, et le rôle de Pol  $\iota$  dans la mutagenèse induite par les UV reste encore controversé même s'il a déjà été rapporté qu'une diminution de son expression conduit à une diminution de la mutagenèse induite par les UV. Cependant, cette diminution reste seulement visible dans des cellules ayant au préalable une déficience Pol  $\eta$  (Dumstorf et al., 2006). Pol  $\iota$  ne semble pas contribuer à la mutagenèse en présence des autres ADN polymérase translésionnelles. Comme il fut déjà précisé, Pol  $\iota$  servirait de polymérase de back-up pour le *bypass* des CPD et peut être considérée comme une polymérase *error-prone* à cause de sa tolérance pour des appariements de type Hoogsteen (Kannouche et al., 2001). Il est important de noter que Pol  $\iota$  possède la plus forte homologie avec Pol  $\eta$  bien que leur capacité à traverser les lésions soit différente.

L'ADN polymérase kappa (Pol  $\kappa$ , *POLK*): Pol  $\kappa$  est l'ADN polymérase translésionnelle la plus conservée des polymérase translésionnelles et l'une de plus fidèles. Pol  $\kappa$  peut traverser un spectre de lésions beaucoup plus restreint, et semble spécialisée dans le *bypass* des adduits-N<sup>2</sup>-dG. Pol  $\kappa$ , en dehors de son activité de *bypass*, plutôt spécialisée dans l'étape d'extension, semble requise après le franchissement du dommage. Le rôle de Pol  $\kappa$  sur la prévention des mutations après induction de dommages reste encore mal définis bien que son absence induise une augmentation de la sensibilité aux UV et qu'elle soit impliquée dans la réparation par excision de nucléotides, tel qu'il sera discuté plus tard (Ogi and Lehmann, 2006). Pol  $\kappa$  semble pouvoir se recruter aux foyers nucléaires après l'induction de dommages à l'ADN. Ce recrutement aux foyers nucléaires post-UV pourrait cependant ne pas se produire en phase S (Waters et al., 2009) mais plutôt en phase G1. D'ailleurs, il fut rapporté que Pol  $\kappa$  en association avec Pol  $\zeta$  et Pol  $\iota$  pourrait participer au franchissement des CPD chez les patients XP-V (Ziv et al., 2009).

L'ADN polymérase zeta (Pol  $\zeta$ , POLZ) : Contrairement aux autres polymérases translésionnelles, Pol  $\zeta$  est constituée de plusieurs sous-unités, composées de REV3 et REV7. REV3, et n'appartient pas à la famille Y des ADN polymérases mais à celle de la famille B. Plus exactement, Pol  $\zeta$  et REV1 sont impliquées dans le franchissement de la plupart des lésions à l'ADN dont le *bypass* des CPD après une exposition aux UV (McNally et al., 2008; Waters et al., 2009; Ziv et al., 2009). Cette polymérase exerce une fonction majeure dans l'induction des mutations post-UV. Cette polymérase translésionnelle est assez fidèle et active dans le franchissement des mésappariements de bases, des adduits à l'ADN, des glycols de thymine. En effet, elle semble particulièrement active pour le *bypass* des dommages distordants de l'hélice d'ADN tels que les 6-4PP comme déjà mentionné. Cette ADN polymérase translésionnelle hétérodimérique est régulée grâce à REV1, qui par interaction avec celui-ci, stimule son recrutement à la fourche de réplication. Cependant, REV1 et Pol  $\zeta$  ont des fonctions identiques mais aussi différentes. REV1, qui est aussi une ADN polymérase translésionnelle, est aussi nécessaire au *bypass* des 6-4PP *in vivo*. Cette polymérase est très importante pour la lutte contre l'induction de dommages et de mutations chez l'humain. Elle joue un rôle à ne pas négliger dans la tumorigenèse post-UV. Son activité de polymérase ne semble pas nécessaire pour le franchissement d'une variété de lésions pour lesquelles son activité de *bypass* est toutefois nécessaire. En effet son activité polymérase pourrait agir juste après la machinerie de réplication, pour répliquer le brin complémentaire ou l'ADNss généré peu après le blocage de la fourche de réplication. De plus, cette dernière pourrait affecter l'activité catalytique des autres ADN polymérases, telle que Pol  $\zeta$ , dont la fonction exacte *in vivo* reste mal caractérisée. REV1, tout comme REV7 de Pol  $\zeta$ , est régulée pendant le cycle cellulaire. L'impact de leur dysfonction ou de leur participation dans les maladies humaines, et plus particulièrement, sur la résistance aux agents chimiothérapeutiques reste encore à établir avec certitude. Il n'est pas rare de voir leur expression augmenter dans certains cancers (Lange et al., 2011). D'ailleurs chez la levure, la surexpression Pol  $\zeta$  entraîne une augmentation de la mutagenèse après exposition aux UV. Il semble que les niveaux de Pol  $\zeta$  doivent être maintenus relativement bas. Son absence chez la souris conduit à une mort embryonnaire précoce (Lawrence, 2002; Waters et al., 2009).

En conclusion, chez l'homme, la déficience Pol  $\eta$ , associée à celle de Pol  $\iota$ , entraîne une augmentation de la mort cellulaire tout comme la déficience Pol  $\zeta$ . La déficience Pol  $\iota$

seule n'entraîne pas de sensibilité significative (Gueranger et al., 2008). Cette dernière étude a été menée dans des cellules déficientes en p53, ce qui pourrait éventuellement biaiser les résultats. Quoiqu'il en soit, il est clair que dans les cellules XP-V, Pol  $\iota$  et Pol  $\zeta$  coopèrent pour le franchissement des CPD, et que dans les cellules normales, ces 2 ADN polymérase avec Pol  $\eta$  agissent toutes les 3 pour permettre aux fourches de réplication de reprendre leur activité de duplication de l'ADN. Chez l'homme, il y aurait 3 ADN polymérase translésionnelles pour le franchissement d'un seul CPD en deux combinaisons différentes, qui dicteraient la nature du franchissement, à savoir *error-prone* ou *error-free* (Shachar et al., 2009). Il est cependant important de remarquer que le franchissement efficace des CPD (*error-free*) assuré par Pol  $\eta$  est peut être un cas de figure unique des ADN polymérase translésionnelles, d'une part en raison de sa fonction qui semble très spécialisée et aussi du rôle clé joué par les UV dans l'évolution de la vie. Les cellules humaines possèdent aujourd'hui plus de 15 ADN polymérase qui conjointement assurent la réplication intégrée de l'ADN génomique en minimisant tout changement de l'information génétique (**Tableau 2**).

#### II.1.4 Mécanisme de franchissement des dommages induits par les UV : l'échange d'ADN polymérase (*Polymerase switch*)

Il existe plusieurs mécanismes pour la tolérance des dommages à l'ADN. Comme mentionné, il y a la synthèse translésionnelle (*error-free* ou *error-prone*), la réversion des fourches de réplication et la recombinaison ou l'échange d'ADN matrice (*template switch*), voir **Schéma 13**. Ces mécanismes, à l'exception de la synthèse translésionnelle, ne seront pas abordés dans cette thèse et sont bien décrits dans la littérature (Branzei, 2011). Ces mécanismes, assurés par les ADN polymérase translésionnelles, sont conservés chez les vertébrés. La synthèse translésionnelle utilise 4 à 5 ADN polymérase et nécessite, comme précisé avant, la combinaison de 2 ADN polymérase translésionnelles différentes pour le *bypass* d'une même lésion. Plus précisément, la première ADN polymérase translésionnelle insère une base en face du dommage alors que l'autre polymérase assure l'extension à partir du dommage sur une courte distance, permettant ainsi à la fourche de réplication de continuer sa progression.

Le mécanisme de synthèse translésionnelle fait intervenir plusieurs acteurs, de façon concertée ou séquentielle, et requiert avant tout le recrutement des ADN polymérases au niveau des fourches de réplication arrêtées. Ce recrutement ne peut se faire sans PCNA et ses modifications post-traductionnelles pour l'échange de polymérase par basculement, aussi dénommé *polymerase switch*.

#### II.1.4.1 PCNA, le clamp moléculaire clé du mécanisme de synthèse translésionnelle

PCNA forme un clan moléculaire autour de la molécule d'ADN et sert essentiellement de plateforme moléculaire ou de cargo pour le recrutement des protéines ou facteurs nécessaires à la fourche de réplication telles que les hélicases mais aussi les ADN polymérases répliquatives de la progression cellulaire. Plus simplement, PCNA forme un anneau moléculaire de processivité autour de l'ADN et fonctionne comme une plateforme d'échange, notamment, pour les ADN polymérases translésionnelles. PCNA n'est pas seulement essentiel à la synthèse translésionnelle et à la réplication. Celui-ci, est aussi impliqué dans le mécanisme de réparation NER. En effet, l'étape de resynthèse «gap filling» du NER requiert PCNA pour l'action de l'ADN répliquative Pol  $\delta$ . Dans le cadre de la synthèse translésionnelle, les ADN polymérases Pol  $\eta$ , Pol  $\iota$  et REV1 se recrutent aux fourches de réplication et se colocalisent avec PCNA et la machinerie de réplication (Hoegge et al., 2002; Kannouche et al., 2003; Kannouche and Lehmann, 2004). Le mécanisme de synthèse translésionnelle consiste en un remplacement des ADN répliquatives par les ADN polymérases translésionnelles. Ce mécanisme est assuré par l'ubiquitination de PCNA. PCNA devient, en effet, ubiquitinée sur la lysine 164 suite à une exposition aux UV, ce qui augmente son affinité avec les ADN polymérases translésionnelles. Ces dernières ont besoin de leur domaine UBD (qui peut reconnaître l'ubiquitine (*Ubiquitin Binding Domain*), pour assurer leur fonction au niveau de la fourche arrêtée (Watanabe et al., 2004). Néanmoins, la nécessité de ce dernier comme élément structural clé de l'activité translésionnelle est encore sujette à controverse. Des contradictions existent encore, la délétion du domaine UBD de Pol  $\eta$  semble, en effet, entraîner aucune modification de l'activité de *bypass* observée et pourrait même l'augmenter

(Acharya et al., 2010). Malgré tout, une étude récente suggère qu'il pourrait exister 2 voies de synthèses translésionnelles, l'une indépendante de l'ubiquitination de PCNA restant faiblement utilisée alors que l'autre voie, dépendante de cette modification de PCNA, est utilisée beaucoup plus fréquemment (Hendel et al., 2011). Le rôle clé de PCNA ubiquitiné doit donc être mitigé dans son implication sur le mécanisme de *polymerase switch* (Andersen et al., 2008; Hendel et al., 2011). Il existe aussi d'autres domaines d'interactions avec PCNA sur les ADN polymérases translésionnelles (Acharya et al., 2008; Hendel et al., 2011).

PCNA est ubiquitiné en réponse aux UV par le complexe Rad6-Rad18, mais cet anneau processif peut être aussi ubiquitiné (chez la levure) par le complexe *Mus2-Ubs3-Rad5*. Cependant dans les cellules humaines, PCNA monoubiquitiné est détectable alors que sa forme polyubiquitinée reste non-détectable. En fait, la monoubiquitination de PCNA permettrait la synthèse translésionnelle alors que sa polyubiquitination conduirait vers un mécanisme de tolérance des dommages encore non-identifié (Andersen et al., 2008). Il faut noter que la déubiquitineuse USP1 est capable de déubiquitiner PCNA en réponse aux UV. Malgré ces controverses, PCNA reste un facteur clé pour l'échange de polymérases au niveau de la fourche de réplication arrêtée.

#### II.1.4.2 Les modèles de franchissement des lésions à l'ADN

Il y a actuellement deux modèles en vigueur pour le mécanisme de franchissement des lésions à l'ADN. Ces 2 modèles, non-mutuellement exclusifs, sont : la resynthèse d'ADN, par comblement des lacunes (modèle de *gap-filling*) et le modèle d'échange, ou de basculement, de polymérases (modèle de *polymerase switch*).

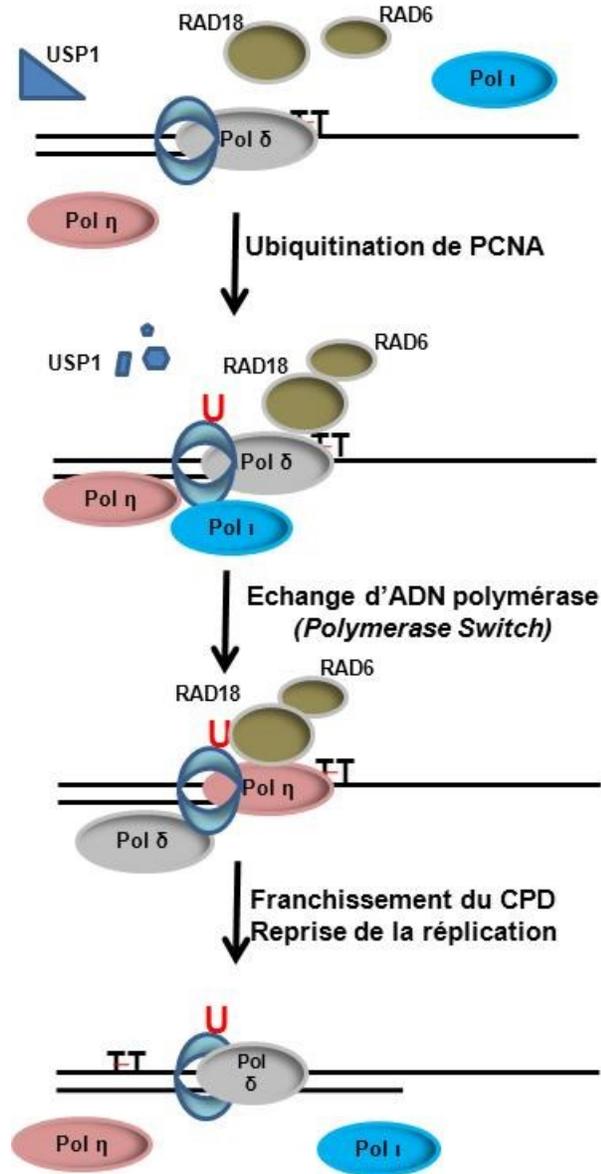
Dans le modèle de *gap-filling*, le franchissement de la lésion se produit après la réplication, derrière la fourche de réplication, et non au niveau de ces dernières, comme dans le modèle de *polymerase switch*. En fait, ce mécanisme *gap-filling* assure la resynthèse de la lacune d'ADN non remplie par les ADN polymérases et agit par activité de reprise (*repriming*) en aval de la lésion. Ce mécanisme pourrait aussi agir pendant la réplication normale sur le brin retardé (fragments d'Okasaki), en dehors de l'induction de dommages. Dans ce mécanisme, les ADN polymérases sont recrutées via PCNA et REV1 sur l'ADN de

la lacune, pouvant atteindre des longueurs de plusieurs centaines de paires de bases (chez la levure). Ce modèle se produit donc principalement en phase S tardive, avant l'entrée en phase G2, dans le but de minimiser ou d'éviter la présence de structures ADNss non réparées, pouvant engendrer des cassures chromosomiques irréversibles (Waters et al., 2009).

Le modèle de *polymerase switch*, tel que décrit plutôt, n'a pas encore été pleinement validé. Il n'est d'ailleurs pas démontré que la monoubiquitination de PCNA soit l'évènement primaire du recrutement des polymérase translésionnelles au niveau de la fourche de réplication. Quoiqu'il en soit, il est clair que l'arrêt de la fourche de réplication est nécessaire à cet évènement et que le franchissement de la lésion à l'ADN par les ADN polymérase nécessite plusieurs étapes moléculaires séquentielles. Schématiquement, suite à l'arrêt de la fourche de réplication et à l'exposition d'une portion d'ADNss, cette dernière sera recouverte de RPA. Cet ADNss-RPA sera capable de lier Rad18, qui permettra le recrutement de Rad6. Ce complexe permettra ensuite la monoubiquitination de PCNA sur chacun de ces monomères. Cette modification de PCNA renforce ainsi les interactions des ADN polymérase translésionnelles et/ou permet leur recrutement stable au niveau de la fourche arrêtée ou du site du dommage (souvent visualisé en foyers des dommages en phase S). L'interaction PCNA-ADN polymérase viendrait stimuler l'échange ou le basculement de l'anneau de processivité PCNA, permettant d'établir une proximité intime entre la lésion et le site actif de l'ADN polymérase translésionnelles pour le *bypass*. Séquentiellement, il est proposé que parallèlement à l'ubiquitination de PCNA, USP1 serait dégradée par le protéasome dans le but d'augmenter l'effet de l'ubiquitination et sa persistance à plus long terme. Cette prolongation de PCNA ubiquitiné, laisse le temps à l'ADN polymérase translésionnelle de se recruter à celui-ci. PCNA agit donc comme une plateforme cargo pour maintenir les ADN polymérase à proximité pour être échangées au site du dommage. Dans le cas de la présence de CPD, il y aurait un *switch* ou basculement entre l'ADN polymérase répllicative Pol  $\delta$  et Pol  $\eta$ , qui permettra à cette dernière d'insérer une base en face du CPD, et de repolymériser 1 à 2 nucléotides. A ce stade, soit Pol  $\eta$  se dissocie ou soit un autre basculement de produit pour échanger à nouveau Pol  $\eta$  par Pol  $\delta$ , dans le but de permettre à la fourche de réplication de ne pas s'effondrer et de reprendre son activité ainsi que le cours normal de la réplication (Lehmann et al., 2007; Sale, 2012; Sale et al., 2012; Waters et al., 2009). L'étape suivante d'extension peut nécessiter l'action de 2 polymérase tel que décrit pour Pol  $\zeta$ .

Ces 2 modèles de *bypass*, *gap filling* ou *polymerase switch*, semble exister conjointement et que leur utilisation pourrait dépendre principalement du contexte cellulaire et moléculaire, toujours dans le but de répondre de la meilleure façon à l'induction de dommages potentiellement délétères et nuisibles pendant la réplication de l'ADN (Waters et al., 2009). Toutefois, ces 2 modèles ne répondent pas encore à la question importante du choix des ADN polymérase au site de la lésion. L'utilisation appropriée des bonnes polymérase translésionnelles pour la bonne lésion pourrait s'effectuer par compétition jusqu'à ce que la polymérase ayant la meilleure affinité pour la lésion réalise le franchissement, mais peut aussi se faire par augmentation locale de la bonne polymérase qui dépendra des niveaux d'ubiquitination de PCNA (balance entre l'Activité Rad18-USP1). L'ubiquitination de PCNA pourrait être un élément central dans l'utilisation appropriée des ADN polymérase translésionnelles. De plus, l'affinité des polymérase pour certaines lésions pourrait augmenter suite à leur interaction avec PCNA (Livneh et al., 2010; Sale, 2012).

En conclusion, lorsque le mécanisme de synthèse translésionnelle ne fonctionne pas bien, il y aura une induction de la fréquence des DSB provenant de l'effondrement de la fourche de réplication bloquée, ce qui entrainera l'intervention de la recombinaison homologue entre autre dans le but de réinitier la réplication. Les lacunes «réplicatives», qui ne seront pas remplies par *gap-filling*, seront résolues par échange d'ADN matriciel (*template switch*) ou par recombinaison homologue simplement. Il est très probable que la résolution d'une fourche de réplication arrêtée en phase S fasse intervenir conjointement plusieurs mécanismes de tolérance des dommages, nécessitant une collaboration entre la synthèse translésionnelle, l'échange d'ADN et la recombinaison homologue (Sale, 2012).



**Schéma 15:** Modèle simplifié de l'échange d'ADN polymérase (ou *Polymerase Switch*) au niveau de la fourche de répliation arrêtée par un CPD. Adapté de (Lehmann et al., 2007).

#### II.1.4.3 ATR et la réparation GGNER des dommages induits par les UV: une régulation dépendante du cycle cellulaire

Tel que précisé, au début de cette partie, l'exposition aux UV induits l'activation de ATR, principalement par l'induction de stress répliatif, conduisant à la phosphorylation d'une multitude de cibles impliquées la progression cellulaire ainsi que la mort cellulaire. D'ailleurs, l'une des cibles de choix ATR, est le suppresseur de tumeurs p53, qui est en plus un régulateur connu de l'activité GGNER (Tibbetts et al., 1999). Grâce à la méthode de réparation basée sur la cytométrie en flux, la réparation des CPD ou des 6-4PP peut être suivie dans chaque phase du cycle cellulaire, grâce au co-marquage des anticorps anti-CPD ou anti-6-4PP avec le iodure de propidium (PI) et ainsi permettre de visualiser la réparation spécifiquement en phase G1, S et G2/M. Cette approche technique a permis d'observer un rôle important de la kinase PI3KK ATR sur l'efficacité de réparation des dommages en phase S par le GGNER. En effet, cette méthode d'analyse de la réparation des CPD a montré que la déficience ATR entraîne une inhibition de l'activité GGNER spécifiquement en phase S et non en phase G1 et G2/M (Auclair et al., 2008), (**article ajouté en Annexe pour consultation**). Ces résultats furent ensuite validés par l'utilisation de cellules de patients ATR-déficientes du syndrome de Seckel (dénommée aussi ATR-Seckel) ainsi que par utilisation d'ARN interférants contre ATR. Cette inhibition de la réparation des CPD et des 6-4PP, indique clairement que la signalisation ATR est exclusivement nécessaire à l'activité GGNER en phase S et qu'il pourrait donc exister un lien ATR-dépendant entre le point de contrôle en phase S et l'exécution de la réparation des dommages UV. De plus, certaines lignées cellulaires cancéreuses furent aussi testées, et une partie d'entre elles exhibent ce défaut de réparation en phase S. La réparation NER en phase S sera dénommé aussi SPR (*S-Phase Repair*) dans la suite de cette thèse. Cependant, l'effet de la déficience ATR sur la réparation GGNER en phase S semble indépendante de p53 (Auclair et al., 2008). Toutefois les conséquences de cette inhibition de la réparation GGNER restent encore indéterminées. Il se pourrait que ces lignées soient plus sensibles à l'action d'agents chimiothérapeutiques. L'effet du point de contrôle S médié par ATR sur le GGNER suppose que ce point de contrôle permette au système de réparation classique de réparer les dommages et stimule aussi la tolérance des dommages au cours de la phase S. Il est donc parfaitement légitime, de se demander si un défaut de synthèse translésionnelle peut ou non influencer la

réparation des dommages en phase S, renforçant ainsi un rôle du point de contrôle de la phase S sur l'excision des dommages au cours de la réplication de l'ADN.

## **II.2 Hypothèse et stratégie expérimentale**

La nécessité de la signalisation ATR pour la réparation des dommages induits par les UV uniquement en phase S, soulève la notion de la nécessité pour la cellule de contrôler la réparation des CPD ou des 6-4PP en phase S. Il se pourrait d'ailleurs que la présence des facteurs du GGNER, pendant la phase S, interfèrent avec les machineries de franchissement des dommages, en créant des portions d'ADNss qui seront rapidement converties en cassures DSB, et qui par conséquent pourront nuire à la réparation post-répllicative. L'activation de la voie ATR semble avoir un effet préventif sur l'effondrement des fourches de réplication (*fork collapse*) et serait nécessaire à la reprise de la réplication. Etant donné que l'activation d'ATR, via l'arrêt de la fourche de réplication, puisse stimuler la réparation GGNER en phase S, l'ADN polymérase translésionnelle Pol  $\eta$  pourrait, aussi bien, contribuer à moduler la réparation GGNER (directement ou indirectement), compte tenu de son rôle clé dans le franchissement des dommages induits par les UV au niveau des fourches de réplication arrêtées.

Auparavant, il a déjà été mis en évidence un lien entre l'activité d'excision de nucléotides et les ADN polymérases translésionnelles. En effet, il a longtemps été considéré que la dernière étape du NER (étape de ligation et resynthèse), consistant au comblement des lacunes d'ADNss, était effectuée par les ADN polymérases répliquatives de haute-fidélité Pol  $\delta$  et Pol  $\epsilon$ . Cependant, aujourd'hui il semble que les ADN polymérases translésionnelles soient impliquées dans cette étape et soient capables d'assurer cette resynthèse dans la réparation GGNER (Livneh et al., 2010; McNally et al., 2008; Ogi et al., 2010). En effet, Pol  $\kappa$  pourrait participer à l'étape de *gap filling* de NER après l'excision du dommage. Il est rapporté que l'inhibition de l'expression Pol  $\delta$ , Pol  $\epsilon$  et Pol  $\kappa$  diminuent considérablement l'activité de resynthèse de lacunes dans les cellules humaines. De plus, ces polymérases seraient différemment recrutées selon l'ubiquitination de PCNA. Pol  $\kappa$  participerait à la resynthèse de 50 % des lacunes post-excision. Plus précisément, il pourrait y avoir 2 types de resynthèse

post-excision, utilisées en fonction du contexte chromatinien et stérique. La moitié des évènements de *gap filling* seront assurée par Pol  $\kappa$ -PCNA-ERCC1 et l'autre moitié par Pol  $\varepsilon$ -CTF18-RFC (Ogi et al., 2010). Ce rôle de Pol  $\kappa$  dans l'activité *gap filling* existe principalement en dehors de la phase S et renforce le rôle clé des ADN polymérase translésionnelles dans la réponse UV, notamment dans l'excision des dommages.

Pour mieux comprendre le rôle des ADN polymérase translésionnelles sur la réparation CPD des 6-4PP en phase S et établir un lien entre ces activités translésionnelles et l'efficacité de réparation GGNER, il est proposé dans cette partie d'étudier le rôle de l'ADN polymérase  $\eta$  sur l'efficacité de réparation des dommages induits par les UV en phase S dans les cellules humaines. Plus précisément, il est proposé de revisiter l'efficacité de réparation GGNER dans les cellules XP-V, dans chaque phase du cycle cellulaire. Même si les évidences que les cellule XP-V ayant une réparation NER normale sont nombreuses et convaincantes dans la grande majorité des études, (Cleaver, 1972; Kleijer et al., 1973; Lehmann et al., 1975; Mitchell et al., 1995; Mitchell et al., 1987), l'analyse de la disparition des dommages en phase S n'a jamais été réellement prise en compte et spécifiquement étudiée, souvent pour des raisons pratiques et techniques. La phase S fut souvent éliminée, entre autre par synchronisation en phase G1/G0, principalement en raison des problèmes de dilution des dommages causée par la réplication de l'ADN. Nous émettons, ici, l'hypothèse que Pol  $\eta$  exerce un contrôle positif sur la réparation des dommages induits par les UV dont les CPD, et que cet effet pourrait être dépendant de l'efficacité de franchissement de la lésion par Pol  $\eta$ . Pour y répondre, nous avons eu recours à une approche expérimentale, globalement semblable à celle déjà appliquée pour mettre en évidence un rôle de ATR sur l'efficacité de réparation des dommages et qui sera décrites plus en détails dans la section suivant (Auclair et al., 2008).

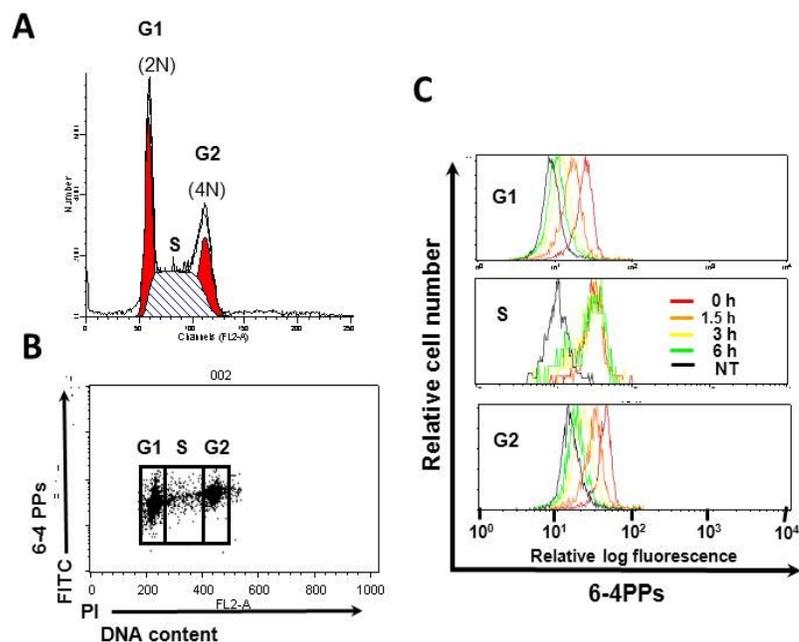
### II.2.1 Stratégie expérimentale

Dans le but d'établir une participation éventuelle de l'activité Pol  $\eta$  sur la réparation GGNER des dommages à l'ADN induits par les UV en phase S, il est proposé d'établir la réparation des CPD et des 6-4PP en fonction du cycle cellulaire dans les cellules humaines normales et Pol  $\eta$  déficientes. La méthode d'analyse de la réparation NER par cytométrie en flux nous fournit le moyen idéal de revisiter la réparation des dommages UV dans les cellules XPV puisque le co-marquage des cellules avec les anticorps anti-CPD ou 6-4PP avec le iodure de propidium, va permettre tel que déjà présenté, de visualiser et quantifier la disparition des dommages dans chaque phase du cycle cellulaire au cours du temps. Cette méthode devrait permettre de vérifier si Pol  $\eta$  pourrait participer directement ou indirectement à la réparation GGNER en phase S et ainsi établir un lien entre la réparation GGNER en fonction du cycle cellulaire avec la synthèse translésionnelle. De plus, cette nécessité de l'activité Pol  $\eta$  à la réparation NER viendrait modifier la vision dans laquelle la déficience du *bypass* des dommages, normalement assuré par Pol  $\eta$ , comme cause de la maladie XP-V et de la mutagenèse induite par les UV observée chez ces patients.

Très simplement, dans un premier temps, les cinétiques de réparation seront établies dans les fibroblastes primaires de peau provenant de patients XP-V. Les résultats obtenus seront ensuite validés par restauration de l'expression de Pol  $\eta$  dans les cellules XP-V. Cette restauration devrait inverser les résultats obtenus et renseigner sur la spécificité de l'effet de la déficience Pol  $\eta$  sur la réparation GGNER en fonction du cycle cellulaire. L'inhibition de l'expression de Pol  $\eta$  dans les cellules normales, par utilisation d'ARN interférants (ARNsi), devrait, quant à elle, pleinement confirmer les résultats du statut SPR des patients XP-V.

Dans le but d'obtenir d'avantage d'évidences mécanistiques, des inhibiteurs chimiques de la réplication de l'ADN seront utilisés comme l'hydroxyurée et l'aphidicoline. Ils seront notamment utilisés pour tester l'effet de l'abrogation de la réplication avant l'exposition aux UV, sur la réparation des dommages en phase S. Ces inhibiteurs de la réplication agissent soit par déprivation du pool de nucléotide (pour l'hydroxyurée, HU) ou soit par inhibition compétitive et irréversible sur l'ADN polymérase (pour l'aphidicoline, Aph.). Cette stratégie devrait permettre d'obtenir des informations claires concernant un lien possible entre le point

contrôle S, la synthèse translésionnelle et la réparation par excision de nucléotide en phase S des dommages induits par les UV.



**Schéma 16:** Exemple d’analyse de la réparation GGNER des 6-4PP en fonction du cycle cellulaire dans les cellules primaires XP30RO (XP-V) après une exposition UV de  $15 \text{ J/m}^2$ , obtenue par la méthode d’analyse GGNER basée sur la cytométrie en flux.

**A.** Exemple de profils du cycle cellulaire permettant l’identification de chaque phase du cycle cellulaire avec le iodure de propidium (PI). Les cellules HCT116 ont été marquées avec le PI, permettant de visualiser la distribution des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire (20 000 cellules utilisées pour l’acquisition). G1, indique la phase G1; S, la phase S et G2, la phase G2 du cycle cellulaire. **B.** Distribution à 2 variables des 6-4PP (FITC) et du contenu ADN (PI) juste après l’induction de dommages ( $t=0$ ). **C.** Résultats représentatifs de la réparation GGNER des 6-4PP, dans chaque phase du cycle cellulaire, obtenus grâce à la méthode d’analyse GGNER basée sur la cytométrie en flux, où un défaut de réparation en phase S est clairement visible.

### II.2.2 Choix des lignées cellulaires

Comme il est proposé d’étudier la réparation NER dans les fibroblastes de peau de patients affectés du syndrome XP-V, nous avons eu recours à 4 différentes lignées cellulaires provenant de patients XP-V et commercialement fournies par l’institut Coriell (*Coriell Institute Cell Repository-NIGMS*). Ces lignées, listées dans le **Tableau 3** à la fin de cette section, sont dénommées XP30RO, XP115LO, XP5MA, et présentent toutes une déficience de

l'expression Pol  $\eta$ . En effet chacune de ces lignées cellulaires possède des mutations dans le gène POLH, conduisant à la production d'une protéine tronquée, qui sera rapidement dégradée.

**Tableau 3:** Listes de lignées fibroblastiques humaines XP-V, ATR déficientes et normales utilisées.

Lignées cellulaires humaines	Coriell# [Ref]	Type cellulaire	mutation gène Pol $\eta$	Changement protéine Pol $\eta$	Taille Pol $\eta$ (AA)
<i>Fibroblastes</i>					
<i>Peau</i>					
(HDSF)GM01652B	GM01652B[[5]	Normale, primaire	--	--	Wt 713
XP30RO*	GM03617[1]	XP-V, primaire	Del104-116	frameshift A <sup>35</sup>	Tr. 42
XP115LO*	GM02359[1]	XP-V, primaire	C1117T	terminaison V <sup>372</sup>	Tr. 372
XP5MA*	GM03379[1]	XP-V, primaire	Del661-764	frameshift K <sup>220</sup>	Tr. 222
XP30ROsv*	[2,6]	XP-V, SV40	Del104-116	frameshift A <sup>35</sup>	Tr. 42
XP30Rosv-Pol $\eta$ /cl6*	[2,6]	XP-V, SV40	Complémentée	--	Wt 713
1BR	[3]	hTERT Normal	--	--	Wt 713
F02-98 <sup>§</sup>	[3]	hTERT ATR-Seckel Syndrome	--	--	Wt 713
<i>Poumons</i>					
HDLF(LL)	[4]	Normale primaire	--	--	Wt 713

(Coriell#)[Ref], Coriell institute cell repository number et références associées; (Wt), wild-type; (Tr.), forme tronquée; (Del), délétion; (SV40), transformée avec le virus SV40; (hTERT), immortalisée avec la télomérases hTERT; (\*), homozygote pour la mutation indiquée; (<sup>§</sup>), lignée de fibroblastes de peau immortalisée hTERT, établie à partir fibroblastes prélevés sur un patient affecté du syndrome ATR-Seckel ayant une mutation hypomorphique dans le gène ATR (2101A→G, transition) avec des niveaux détectable de Pol  $\eta$ . [1], (Johnson et al., 1999); [2], (Kannouche et al., 2001); [6], (Stary et al., 2003); [3], (O'Driscoll et al., 2003); [4], (Brown et al., 1997); [5], (Rouget et al., 2008).

Pour étudier l'effet, de la restauration de l'expression de Pol  $\eta$  dans des cellules XP-V déficientes, les cellules XP30RO immortalisées avec le SV40 (XP30ROsv) ont été utilisées pour l'expression stable de Pol  $\eta$  et aimablement fournies par le Dr. Allan Lehmann (*University of Sussex*). Ces cellules ont été désignées XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6. De plus, ces cellules présentent l'avantage d'avoir été caractérisées et largement utilisées dans la littérature (Stary et al., 2003; Stary and Sarasin, 1996). Bien évidemment, l'effet de la suppression de Pol  $\eta$  dans les cellules normales sera vérifiée dans les fibroblastes primaires de poumons (HDLF), déjà utilisés en première partie de cette thèse mais aussi ailleurs (Auclair et al., 2008), pour leur bonne efficacité à être transfectées par les ARNsi. Les cellules primaires normales

utilisées en contrôle seront les fibroblastes de peau primaires GM01652B également utilisées en première partie de cette thèse.

## **II.3 Matériels et méthodes**

### **II.3.1 Types et Cultures cellulaires**

Les fibroblastes primaires normaux (GM01652B), et les fibroblastes primaires de patients XP-V, XP30RO (GM03617), XP115LO (GM02359) et XP5MA (GM03379) ont été commercialement fournies par l'institut Coriell (*Coriell Institute Cell Repository*). Les lignées cellulaires XP30ROsv et XP30ROsv-Pol $\eta$ /cl6, transformées avec le SV40, ont été gracieusement fournies par le Dr. A. Lehmann (*University of Sussex*). Les lignées cellulaires transformées avec la télomérase humaine (hTERT), les fibroblastes normaux hTER (1BR) et hTERT ATR-Seckel, (F02-98), ont été données par le Dr. P.A Jeggo (*University of Sussex*). Les cellules HDLF (dénommées aussi LL) ont été fournies par les Dr. J. Sedivy (*Brown University*), tel que décrit à la section I.3.1,(Brown et al., 1997). Les fibroblastes primaires ont été cultivés avec du milieu complet MEME (Eagle's Minimum Essential Medium, *Wisent*), supplémenté avec 10% avec de sérum fœtal de bovin, de la L-glutamine et des antibiotiques (*Wisent*), alors que les cellules transformées SV40 ou immortalisées hTERT, ont été cultivées avec du milieu complet DMEM (Dulbecco's Minnum Essential Medium, *Wisent*) supplémenté également avec 10% sérum fœtal bovin et des antibiotiques.

### **II.3.2 Construction et expression des fusions EGFP-Pol $\eta$ dans les cellules XP30ROsv**

L'ADNc de Pol  $\eta$  (forme Wt) a été généré et amplifié par RT-PCR à partir d'ARN totaux provenant de cellules HDLF (de façon similaire à ce qui est décrit à la section I.3.6) grâce à l'utilisation de la paire d'amorce sens (ATGGCTACTGGACAG GATCGAGT) et anti-sens (GGCAGCACTAATGTGTTAATGGCTT). L'ADNc wt, ainsi amplifié, a été ensuite sous-cloné avec le vecteur pGemTeasy™ (*Promega*), pour être ensuite cloné dans le

vecteur pEGFP-N1 (*Clontech*) par amplification PCR à partir de vecteur pGemteasy-Pol  $\eta$ -Wt. Brièvement, Pol  $\eta$  Wt a été clonée dans le vecteur pEGFP-N1 par amplification PCR avec la paire d'amorces indiquées au **Tableau 4**. Le produit PCR a été digéré avec les enzymes de restriction *XhoI* et *EcoRI* afin de cloner en phase l'ADNc codant Pol  $\eta$  avec l'EGFP, en position C-terminale de la fusion EGFP-Pol  $\eta$ -Wt. Les mutants EGFP-Pol  $\eta$ - $\Delta$ Ct et EGFP-Pol  $\eta$ -PIP1/2 ont été générés par PCR et par mutagenèse dirigée respectivement par utilisation des amorces indiquées (**Tableau 4**) et avec la même méthode déjà décrite ailleurs (Rouget et al., 2005). La séquence de toutes les constructions générées ont été vérifiées par séquençage automatique dideoxy (Facilités de séquençage et génomique, *Université de Montréal*)

**Tableau 4:** Liste des amorces PCR et de mutagenèse dirigée utilisées pour générer les fusions EGFP-Pol  $\eta$ -Wt, EGFP-Pol  $\eta$ - $\Delta$ Ct et EGFP-Pol  $\eta$ -PIP1/2.

ADNc	Amorce	Sites restriction	Séquence (5'→3')
Pol $\eta$ -wt	Sens	<i>XhoI</i>	GGACCGCTCGAGATGGCTACTGGACAGGAT
	Anti-sens	<i>EcoRI</i>	CTTTTCCTTGAATTCGATGTGTTAATGG
Pol $\eta$ - $\Delta$ -Ct	Sens	<i>XhoI</i>	GGACCGCTCGAGATGGCTACTGGACAGGAT
	Anti-sens	<i>EcoRI</i>	CTTTTCCTTGAATTCGTACCAGGGAGCCACACTT

Mutagenèse dirigée	Mutation ponctuelle	Amorce Mutagène	Sequence (5'→3') *
Pol $\eta$ -PIP1/2 mut	F443A;L444A (PIP1 mut)	Sense	TCTACAGACATCACCAGC <b>GC</b> CGAGCAGTGACCCAAGTTC
		Anti-Sense	GAACCTGGGTCACTGCTC <b>GC</b> GCCTGGTGATGTCTGTAGA
	F707A;F708A (PIP2 mut)	Sense	CAAACATTGGAATCAG <b>CTGC</b> TAAGCCATTAACACATTAG
		Anti-Sense	CTAATGTGTTAATGGCTTAG <b>GCAGCT</b> GATTCCAATGTTTG

\*les sites mutés sont indiqués en gras et soulignés.

Les cellules XP30ROsv exprimant EGFP-Pol  $\eta$ -Wt, EGFP-Pol  $\eta$ - $\Delta$ Ct et EGFP-Pol  $\eta$ -PIP1/2 ont été générées par transfection avec la lipofectamine2000™ (*Invitrogen*), suivie d'une sélection pour 2 semaines avec 200  $\mu$ g/mL de G418 (*Wisent*). L'enrichissement de la population cellulaire exprimant les fusions EGFP-Pol  $\eta$  a été réalisé par tri cellulaire des cellules EGFP positives avec le cytomètre FACSVantage SE DiVa option, équipés avec une ouverture (*nozzle*) de 70  $\mu$ m à 25PSI (*Becton-Dickinson*). Très succinctement, les cellules ont été triées selon leur intensité EGFP en 2 fois, entrecoupées et suivies d'une période de culture d'une semaine. Avant de procéder à l'analyse de la réparation, l'expression de chaque fusion EGFP-Pol  $\eta$ -Wt, EGFP-Pol  $\eta$ - $\Delta$ Ct et EGFP-Pol  $\eta$ -PIP1/2 a été vérifiée par immuno-

précipitation et immuno-buvardage tel que décrit dans la section suivante. Les cellules ont été exposées aux UV aux doses indiquées et précisées si nécessaire (voir aussi paragraphe I.3.2)

### II.3.3 Lysats cellulaires, immuno-précipitation de Pol $\eta$ et son immuno-détection par immuno-buvardage de type Western

Pol  $\eta$  est détectée par une immuno-précipitation, suivie d'une détection par immuno-buvardage de type Western. Les extraits cellulaires totaux sont obtenus avec le tampon RIPA 1x, additionné d'inhibiteurs de protéases et de phosphatase tel que décrit à la section I.3.7 et par (Loignon and Drobetsky, 2002). L'immuno-précipitation de Pol  $\eta$  a été réalisée conformément à ce qui a déjà été décrit (Inui et al., 2008; Tanioka et al., 2007; Thakur et al., 2001). L'immuno-précipitation et l'immuno-buvardage de type Western sont réalisés grâce à l'utilisation des anticorps monoclonaux anti-Pol  $\eta$  H-300 et B7 respectivement (*Santa Cruz Biotech.*). Dans l'objectif de vérifier les niveaux de protéines utilisées pour l'immuno-précipitation, les surnageants ont été gardés et conservés à -80°C. Les niveaux d'actine ont ensuite été vérifiés sur 5% du lysat cellulaire total par SDS-PAGE et immuno-buvardage de type Western.

Dans l'objectif de vérifier et d'évaluer l'inhibition de l'expression de Pol  $\eta$  par utilisation d'ARNsi dans les cellules LL(HDLF) de la façon la plus quantitative, la méthode d'immuno-précipitation a été délaissée pour une détection de Pol  $\eta$  liée à la chromatine. En effet,  $1.10^6$  de cellules HDLF ont été lysées avec 0,5 % Triton-X-100/CSK [tampon CSK:10 mM Pipes (pH=6,8) (*Sigma*), 300 mM sucrose (*Sigma*), 100 mM NaCl (*Sigma*), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (*Sigma*), 1 mM EGTA (*Sigma*), 20 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub> (*Sigma*), 1 mM 4-(2-AminoEthyl)BenzeneSulfonyl Fluoride (*Roche*)], puis incubées 15 minutes sur glace puis centrifugées. Les culots sont relavés délicatement avec le tampon 0,5 % Triton-X-100 puis ré-incubés pour encore 15 minutes, puis centrifugés. Le culot est ensuite resuspendu dans 30  $\mu$ L de tampon de chargement SDS-PAGE Leammli 1x pour la détection par immuno-buvardage de type Western. Avec ce type d'extraction, Pol  $\eta$  est détectée avec l'anticorps monoclonal anti-Pol  $\eta$  H-300 avec une dilution de 1/1000. Enfin, pour vérifier les niveaux de protéines chargées sur le gel et ainsi évaluer au mieux l'inhibition de l'expression de Pol  $\eta$ , la membrane PVDF traitée et ré-hybridée avec un anticorps anti-PCNA, PC-10 (*Santa Cruz Biotech.*).

#### II.3.4 Analyse de la localisation cellulaire des cellules XP30ROsv exprimant les différentes protéines fusionnées EGFP- Pol $\eta$ sauvage et mutantes

Pour visualiser la localisation des constructions EGFP-Pol  $\eta$ -Wt, EGFP-Pol  $\eta$ - $\Delta$ Ct et EGFP-Pol  $\eta$ -PIP1/2, les cellules, après le tri cellulaire (voir section II.3.2), sont mises en cultures sur des pétris 35 mm, contenant une lamelle de verre, 24 h avant la fixation cellulaire. Les cellules sont ensuite fixées avec 3,7 % para-formaldéhyde pour 20 minutes à température pièce, puis lavées deux fois avec le PBS. Les lames sont ensuite montées avec un agent anti-flou ProLong™ Gold (*MolecularProbes, Invitrogen*), contenant le DAPI, permettant de colorer de manière fluorescente l'ADN par intercalation, et ainsi visualiser les noyaux. Les lames sont observées avec un microscope à fluorescence inverse (*Zeiss*) Axio Observer A1, équipé avec une caméra digitale QICAM Fast 1394 (*Qimaging*) et sont analysées avec le logiciel Northern Eclipse (*Empix Imaging*).

#### II.3.5 Imagerie des foyers (*foci*) Pol $\eta$ dans les cellules XP30ROsv en temps réel

Brièvement,  $6.10^4$  cellules EGFP-Pol  $\eta$ -Wt et EGFP-Pol  $\eta$ -PIP1/2 ont été cultivées sur des pétris 35 mm de diamètre avec un fond de verre (pour permettre l'imagerie en temps réel de ces dernières) et cultivées 24 h avant l'exposition aux UV et l'enregistrement tel que décrit à la section II.3.1. Avant de procéder au traitement UV et à l'enregistrement, le milieu DMEM est remplacé par du milieu OptiMEM™ (*Invitrogen*) sans phénol rouge, afin de ne pas interférer avec la auto-fluorescence GFP (absorption d'une partie de l'énergie d'excitation), supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin sans antibiotiques. Les cellules sont ensuite exposées à  $15 \text{ J/m}^2$  UV et observées avec un microscope IX71 (*Olympus*) avec un objectif 100 x à immersion. L'acquisition des images fut réalisée avec une camera Retiga 2000R (*Qiamging*). Le microscope, équipé avec un plateau automatique MAX201 (*Thorlabs*), dont la camera et ce dernier sont contrôlés avec Labview™ (*National Instrument*) par un programme spécialement créé pour l'acquisition de 100-150 images contiguës couvrant approximativement une région de  $1\text{mm}^2$  (1,18 mm x 0,88 mm). La même région a été imagée avant et après l'irradiation UV. Les foyers nucléaires sont détectés et quantifiés par une analyse automatisée des images à l'aide d'un programme spécialement réalisé avec MatLab

(*Mathworks*). Succinctement, les seuils d'intensité sont établis, dans un premier temps, par la méthode de Otsu (Otsu, 1979). Les pixels du premier plan sont utilisés comme masque pour sélectionner les noyaux et un filtre gaussien est ensuite appliqué afin de sélectionner que les éléments de 0.5  $\mu\text{m}$  approximativement. Les foyers sont ensuite identifiés par un maximum local de fluorescence et dénombrés pour chaque noyau sélectionné. Un minimum de 50 noyaux EGFP-Pol  $\eta$ -Wt et EGFP-Pol  $\eta$ -PIP1/2 pour chaque condition a été analysé.

### II.3.6 Suppression de l'expression de Pol $\eta$ par utilisation d'ARN interférants, ARNsi

L'inhibition de l'expression de Pol  $\eta$  dans les cellules HDLF, a été effectuée par transfection transitoire d'ARNsi contre Pol  $\eta$  (*sc-36289*) et control (*sc-37007*), (*Santa Cruz Biotech.*). Plus exactement, les cellules HDLF ont été cultivées dans des pétris 35 mm dans du milieu complet sans antibiotique, pour une durée de 24 h pour être ensuite transfectées avec la Lipofectamine2000™ (*Invitrogen*) selon les recommandations du manufacturier. Deux jours après transfection, les cellules sont exposées aux UV et incubées jusqu'au temps nécessaire pour l'analyse de réparation. 2 pétris sont lysées pour vérifier la suppression de l'expression de Pol  $\eta$  comme il est indiqué à la section II.3.3.

### II.3.7 Traitement des cellules avec les inhibiteurs de la duplication de l'ADN

Les cellules ont été cultivées 2 heures dans du milieu complet en présence ou en absence de 15  $\mu\text{g/mL}$  d'aphidicoline (*Sigma*) ou 10 mM d'hydroxyurée (*Sigma*). Les doses utilisées ici permettent d'inhiber rapidement la réplication cellulaire (en 1-2 heures de traitement) sans observer d'effets toxiques, aux temps de réparation post-UV sélectionnés, aux cellules XP30RROsv, XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6, 1BR et F02-98 (Pedrali-Noy et al., 1980; Wright et al., 1990). En effet, Ces inhibiteurs de réplication n'induisent pas d'effets toxiques notables lorsqu'ils sont utilisés à court terme, pour inhiber transitoirement la réplication de l'ADN Les cellules sont ensuite lavées plusieurs fois avec du PBS puis exposées aux UV avec du PBS tel que décrit au paragraphe I.3.2. Après irradiation UV, du milieu frais dépourvus d'inhibiteurs

de la synthèse d'ADN est ajouté. Les cellules sont ensuite incubées aux temps post-UV désirés.

### II.3.8 Survie cellulaire clonogénique

Les cellules ont été cultivées sur des pétris de 100 mm puis exposées à des doses UV de 0, 7.5 et 15 J/m<sup>2</sup>, puis immédiatement décollées du pétris par ajout de trypsine et remises en culture avec le nombre approprié de cellules en fonction de la dose UV. Les cellules sont ensuite incubées pour deux semaines. Les colonies cellulaires (>20 cellules) sont dénombrées par fixation et coloration avec une solution de bleu de méthylène (0.5 % de bleu de méthylène avec 20 % méthanol). La survie observée est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non exposées aux UV.

### II.3.9 Analyse de la réparation GGNER en fonction du cycle cellulaire

L'élimination des dommages des 6-4PP a été mesurée de la même façon que dans la première partie de cette thèse (voir section I.3.8), sur une période de 6 h post-UV mais avec cependant quelques modifications pour les cellules XP30ROsv, exprimant stablement les différentes fusions EGFP-Pol  $\eta$ -Wt. En raison de l'interférence de l'auto-fluorescence de l'EGFP avec les signaux FITC, l'anticorps secondaire conjugué anti-souris Alexa-Fluor700 à une dilution de 1/400, fut utilisé à la place de l'anticorps anti-FITC utilisé habituellement. Les acquisitions ont donc été réalisées avec un cytomètre en flux LSRII équipé avec un laser argon (bleu, 488nm) et laser hélium (rouge, 633 nm) en conjonction avec les filtres appropriés. Pour l'évaluation de l'élimination des CPD en fonction du cycle cellulaire, une approche de triple marquage BrdU/PI/CPD a été utilisée dans le but de suivre, en même temps, la progression cellulaire jusqu' à 24 h post-UV. Dans ce but, les cellules ont été irradiées à 5 ou 15 J/m<sup>2</sup> UVC. Au temps t=0, les cellules ont été irradiées, puis marquées en chasse durant 30 minutes avec 30  $\mu$ M BrdU (*Sigma*), puis récoltées immédiatement. Pour les autres temps, pour éviter le plus possible les artefacts de la photolyse du BrdU induite par les UV, les cellules furent

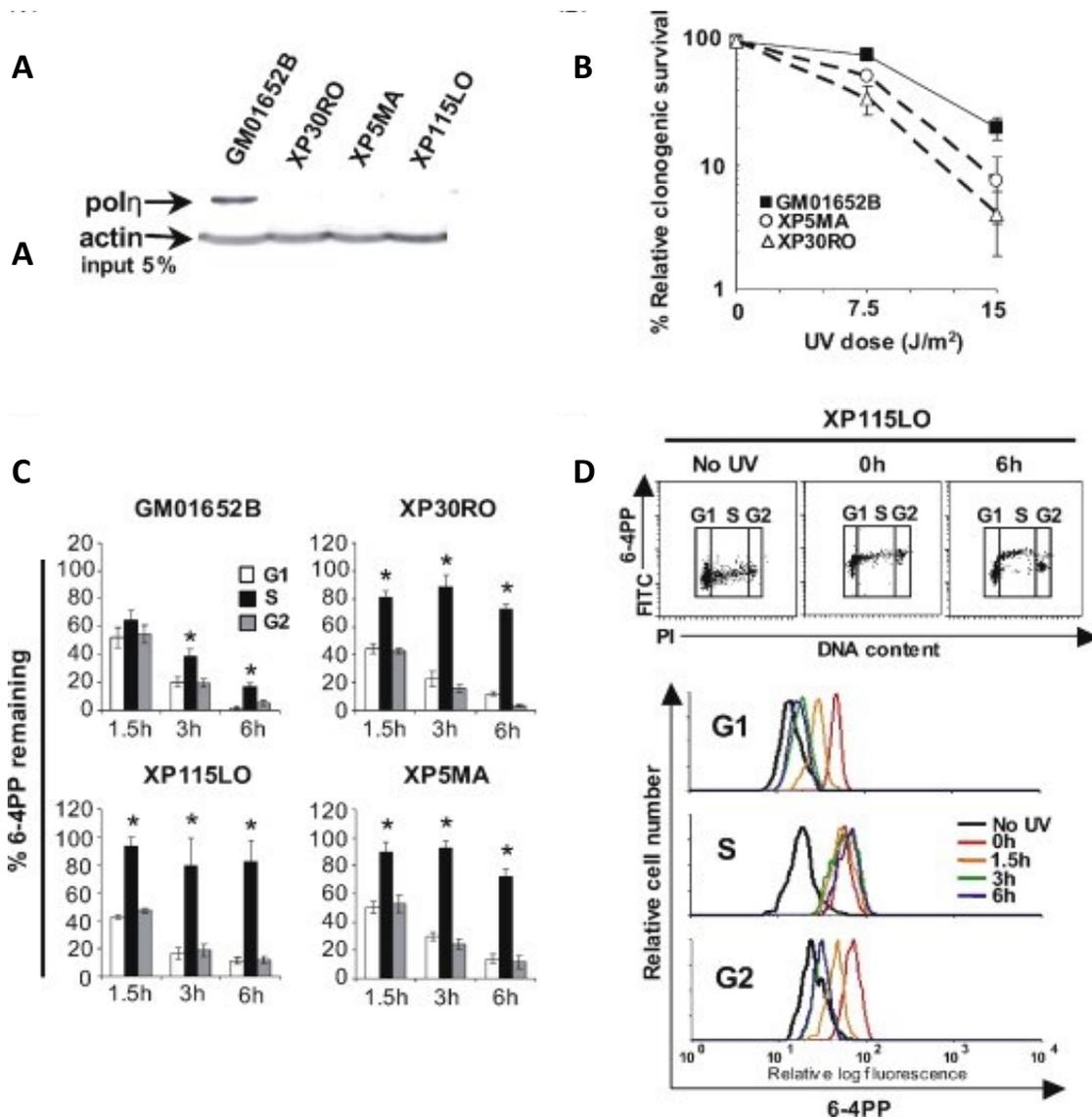
irradiées en premier, puis marquées en chasse avec le BrdU 30 min post-UV, puis lavées au PBS avec du milieu frais complet jusqu'au temps d'incubation désiré. Au temps indiqués d'analyse de la réparation, les cellules sont récoltées par ajout de trypsine et resuspendues dans 1 mL de PBS puis fixées à l'éthanol 99 % tel qu'indiqué au paragraphe I.3.8. Toutefois, après le marquage avec l'anticorps secondaire anti-FITC, les cellules sont incubées avec l'anticorps conjugué avec l'Alexa-Fluor647 anti-BrdU (*Molecular Probes/Invitrogen*), dilué à 1/200 dans le PBS-TB et incubée pour 1 h. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 300  $\mu$ L PBS contenant 5  $\mu$ g/mL d'iodure de propidium, puis analysées avec un cytomètre en flux FACSCaliber (*Becton-Dickinson*). Les intensités de fluorescence sont obtenues par délimitation des populations cellulaires en fonction de chaque phase du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2/M).

## **II.4 Résultats**

### **II.4.1 Statut de la réparation NER des fibroblastes de patients XP-V en fonction du cycle cellulaire**

Dans un premier temps, les fibroblastes primaires de peau provenant de patients XP-V telles que les cellules XP30RO, XP115LO et XP5MA, ont été sélectionnés pour leur disponibilité commerciale et leur inhabilité à exprimer Pol  $\eta$ . L'absence de toute expression de Pol  $\eta$  dans ces cellules en fait des lignées cellulaires de choix puisque Pol  $\eta$  n'est pas fonctionnelle. Avant de tester la capacité des cellules à réparer les dommages induits par les UV, il est nécessaire de vérifier le statut Pol  $\eta$  dans ces cellules XP-V primaires. Tel qu'attendu et contrairement aux cellules normales (GM01652B), les lignées cellulaires XP30RO, XP115LO et XP5MA ne montrent aucune expression détectable de Pol  $\eta$  comme illustré à la **Figure II.1A** par immuno-précipitation. En effet, l'immuno-précipitation de Pol  $\eta$  dans les lysats cellulaires XP30RO, XP115LO et XP5MA avec l'anticorps monoclonal anti-Pol  $\eta$  (H-300), suivie de la détection avec l'anticorps polyclonal anti-Pol  $\eta$  (B7), montre une absence d'expression détectable de Pol  $\eta$  dans ces lignées cellulaires XP-V. Cette absence d'expression Pol  $\eta$  confirme donc le statut XP-V des lignées sélectionnées XP30RO, XP115LO et XP5MA. De plus, les cellules XP-V exhibent une diminution modérée de la

survie cellulaire clonogénique après exposition à des doses sous-létales UV (**Figure II.1B**), ce qui est parfaitement en accord avec leur sensibilité rapportée, connues pour être modérée, aux UV (Arlett et al., 1975). L'ensemble de ces tests sur les cellules XP-V valident pleinement leur utilisation pour l'étude de l'effet de la déficience Pol  $\eta$  sur l'efficacité de réparation GGNER en fonction du cycle cellulaire. Dans un premier temps, la réparation des 6-4PP en fonction du cycle sera analysée dans ces lignées cellulaires grâce à la méthode de réparation NER basée sur la cytométrie en flux, déjà appliquée avant (Auclair et al., 2008). Succinctement, après une exposition à 15 J/m<sup>2</sup> d'UVC (254 nm), tel que décrit dans la section matériels et méthodes, les cellules primaires normales et XP-V sont fixées aux temps post-UV indiqués à la **Figure II.1C**, puis marquées avec l'anticorps monoclonal anti-6-4PP (KTM50) qui sera immuno-déecté avec un anticorps secondaire anti-FITC (fluorescéine). Juste avant l'analyse avec le cytomètre en flux, les cellules seront co-marquées avec le iodure de propidium ce qui permettra de délimiter (*gate*) chaque population cellulaire en fonction de leur contenu en ADN et de mesurer spécifiquement la réparation NER dans chaque phase du cycle cellulaire tel qu'exemplifié à la **Figure II.1D**. Cette méthode permet donc de suivre au cours du temps la disparition spécifique des 6-4PP, et comme nous verrons aussi des CPD, en fonction du cycle cellulaire (les phases G1/G0, S et G2/M) à l'échelle de la cellule. La réparation des 6-4 PP peut donc ainsi être quantifiée par rapport aux niveaux initiaux de dommages au temps 0, et est ainsi exprimée en pourcentage de réparation tel que graphiquement illustré à la **Figure II.1C-D**. Contre toutes attentes, tous les fibroblastes XP-V primaires sélectionnés pour cette étude et contrairement aux fibroblastes normaux exhibent une déficience claire et significative de la réparation des 6-4PP spécifiquement en phase S et pas dans les autres phases du cycle cellulaire. En effet, ce défaut de réparation GGNER des 6-4PP s'observe uniquement pour les cellules XP-V en phase S et non pour les cellules en phase G1/G0 et en phase G2/M (**Figure II.1C**), alors que les cellules normales exhibent une réparation beaucoup plus homogène entre les phases du cycle cellulaire. Les cellules normales montrent toutefois un léger ralentissement significatif de la cinétique de réparation en phase S quand comparée aux autres phases du cycle. Tel qu'il fut rapportés à plusieurs reprises, les 6-4PP sont presque totalement réparés dans les 6 à 8 heures suivantes l'exposition aux UV dans les phases G1/G0 et G2/M (**Figure I.3**) et dans (Auclair et al., 2008).



**Figure II.1:** Réparation des 6-4 PP en fonction du cycle cellulaire dans les cellules primaires HDSF normales ou provenant de patients XP-V après une exposition à 15 J/m<sup>2</sup> UVC.

**A.** Détection de l'ADN polymérase eta (Pol η) dans les cellules HDSF normales (GM01652B) et dans les HDSF provenant de patients XP-V (XP30RO, XP5MA et XP115LO), par immuno-précipitation suivie d'une immuno-détection par immuno-buvardage. **B.** Survie clonogénique des HDSF normales et XP-V exposées ou non à 7.5 et 15 J/m<sup>2</sup> UVC. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes ± S.E.M. **C.** Représentation graphique de la cinétique de réparation des 6-4PP en fonction du cycle cellulaire dans les cellules HDSF normales et XP-V tel qu'indiquées. La réparation 6-4PP est exprimée en pourcentage relatif à l'intensité de fluorescence à t=0 (correspondant aux niveaux initiaux de dommages) de quatre expériences indépendantes ± S.E. \*p<0.05, indique une différence significative entre la phase S et la phase G1 (test t-student bilatérale). **D. (en haut),** Résultats représentatifs illustrant la cinétique de réparation des 6-4 PP en fonction de chaque phase du cycle cellulaire (G1, S, G2) montrant la distribution des intensités de fluorescence (FITC) en fonction du contenu ADN(PI). **(En bas),** Surimposition des histogrammes de fluorescence FITC en fonction de chaque phase du cycle cellulaire de 0 à 6 h post-UV, comme indiquées. No UV, indique les cellules HDSF non exposés aux UV.

Néanmoins, nous ne pouvons pas savoir si ces 6-4 PP non-réparés persistent au-delà de 24 h post-UV, en raison du mouvement temporel des cellules d'une phase à l'autre, en particulier de la phase G1 vers S et de la phase G2/M vers G1.

Suite à l'inhabilité des cellules XP-V à réparer les 6-4PP en phase S, il est à présent logique de se demander si la déficience Pol  $\eta$  entraîne aussi une déficience en réparation GGNER des CPD dans les cellules XP-V. Cependant, en ce qui concerne l'analyse de la réparation des CPD, il est impératif de contrôler les mouvements cellulaires dans les différentes phases du cycle, afin de cibler les bonnes populations pour l'analyse de réparation avec la méthode basée sur la cytométrie en flux. Plus exactement, même si les cellules prolifèrent lentement après UV, les temps d'analyse adéquats de la réparation pour les CPD sont souvent des temps plus tardifs tels 24 h et 48 h post-UV auxquels bien souvent les cellules ont malheureusement déjà progressé à travers les phases du cycle cellulaire. Il a donc été nécessaire de dériver la méthode d'analyse de la réparation NER en fonction du cycle cellulaire en procédant à un triple marquage dans le but, de quantifier la disparition des CPD sans les biais pouvant être imposés par la prolifération cellulaire. Une différence de prolifération cellulaire, même modérée, entre les cellules normales et XP-V conduirait à un biais important des résultats observés. Pour cela, en plus du co-marquage PI et de l'anti-corps anti CPD (KTM53), une incorporation en champ pulsé avec du BrdU a été réalisée avant l'exposition aux UV, afin de marquer les cellules en phase S au moment de l'irradiation UV pour permettre leur suivi au cours de la réparation GGNER en phase S post-UV. Grâce à ce triple marquage il donc a été possible de suivre adéquatement la réparation des CPD, à 24h post-UV, en fonction du cycle cellulaire dans les cellules primaires normales (GM01652B) et XP-V (XP30RO). L'incorporation BrdU en champ pulsé des cellules normales et XP-V et le suivi de leur progression à 24 h post-UV, illustré à la **Figure II.2A**, montre bien les différences de progression cellulaire observées, et rapportées à multiples reprises, entre ces cellules après UV, voir **Figure Supp.II.1A** en Annexe. Déjà à 24 h post-UV, on constate un ralentissement plus prononcé de la progression cellulaire dans les cellules XP-V que dans les cellules normales. D'ailleurs, à 48 h post UV, les cellules ont trop progressée dans les différentes phases du cycle, et par conséquent, ce temps d'analyse ne permet pas une analyse fiable de la réparation CPD avec notre méthode. Tel qu'envisagé, les cellules XP30RO

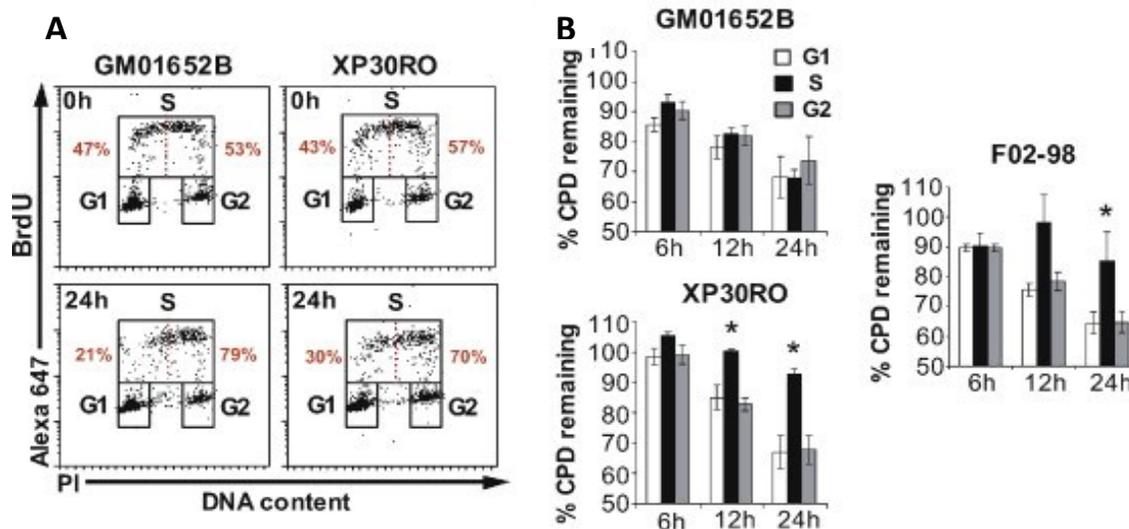
primaires présentent, à la **Figure II.2B**, un défaut de réparation des CPD uniquement visibles en phase S et non dans les phases G1/G0 et G2/M. Pour cette analyse, un contrôle négatif de défaut de réparation en phase S a été inclus, dans le but de s'assurer de la fiabilité de l'analyse. Ce contrôle, ici représenté par les cellules fibroblastes ATR-Seckel (F02-98), tel qu'attendu, montre un défaut de réparations des CPD seulement en phase S, comme les cellules primaires XP30RO. Dans les 3 souches de fibroblastes étudiées, toutes montrent une réparation normale des CPD dans les phases G1/G0 et G2/M, avec 60 à 70 % des CPD qui ne sont pas encore réparés à 24 h post UV. Les cellules XPV et ATR-Seckel démontrent, en revanche, une inhibition de l'efficacité GGNER en phase S avec une persistance approximative de 90 % des dommages à 24 h post UV.

L'ensemble de résultats présentés dans les **Figures II.1 et II.2**, montrent, sans équivoque, un défaut de réparation des 6-4PP et CPD, uniquement en phase S et suggère, tel que déjà rapporté (Auclair et al., 2008), une régulation GGNER dépendante du cycle cellulaire, qui est abrogée en absence de Pol  $\eta$ . Etant donné que les CPD persistants représentent les dommages les plus fréquents et les plus mutagènes (Melnikova and Ananthaswamy, 2005), ce défaut de réparation par excision de nucléotides en phase S (défaut SPR), pourrait participer à l'induction élevée des mutations (mutagénèse) après une exposition UV chez les patients XP-V (Stary et al., 2003).

#### II.4.2 Le défaut de réparation en phase S dans les cellules XP-V est attribuable à la perte de fonction Pol $\eta$

Les résultats précédents suggèrent fortement que la déficience Pol  $\eta$  occasionne un défaut GGNER en phase S. Dans le but de tester cette possibilité, à savoir si une perte fonctionnelle de Pol  $\eta$  est la cause du défaut SPR, l'évaluation de la réparation des 6-4PP a été réalisée, dans un premier temps, dans les cellules XP30RO, immortalisée avec les SV40 (XP30ROsv) dans lesquelles la fonction Pol  $\eta$  a été restaurée. Dans un deuxième temps, l'évaluation sera effectuée dans les fibroblastes primaires de poumons HDLF (dénommée

aussi ici LL) où l'expression de Pol  $\eta$  a été inhibée par utilisation d'ARNsi exprimés transitoirement.



**Figure II.2:** La réparation GGNER en phase S des CPD est défaillante dans cellules primaires XP-V exposées à 15 J/m<sup>2</sup> UVC.

**A.** Distribution à 2 variables de l'incorporation BrdU (Alexa-Fluor647) en fonction du contenu ADN (PI) des HSDF normaux (GM01652B) et XP-V (XP30RO) à 0 h et 24 h post-UV. Les lignes pointillées et les nombres en rouge indiquent les pourcentages des cellules en phase S précoce (nombres de gauche) et en phase S tardive (nombres de droite). **B.** Représentation graphique de la réparation GGNER des CPD en fonction du cycle cellulaire dans les cellules HSDF normales (GM01652B), XP-V (XP30RO) et dans les cellules immortalisées hTERT Seckel-ATR (F02-98) après une exposition à 15 J/m<sup>2</sup>. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réparation relatif à t=0, et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ± S.E., \*p<0.05, indique une différence significative de la phase S relative à la phase G1 (test t-student bilatéral).

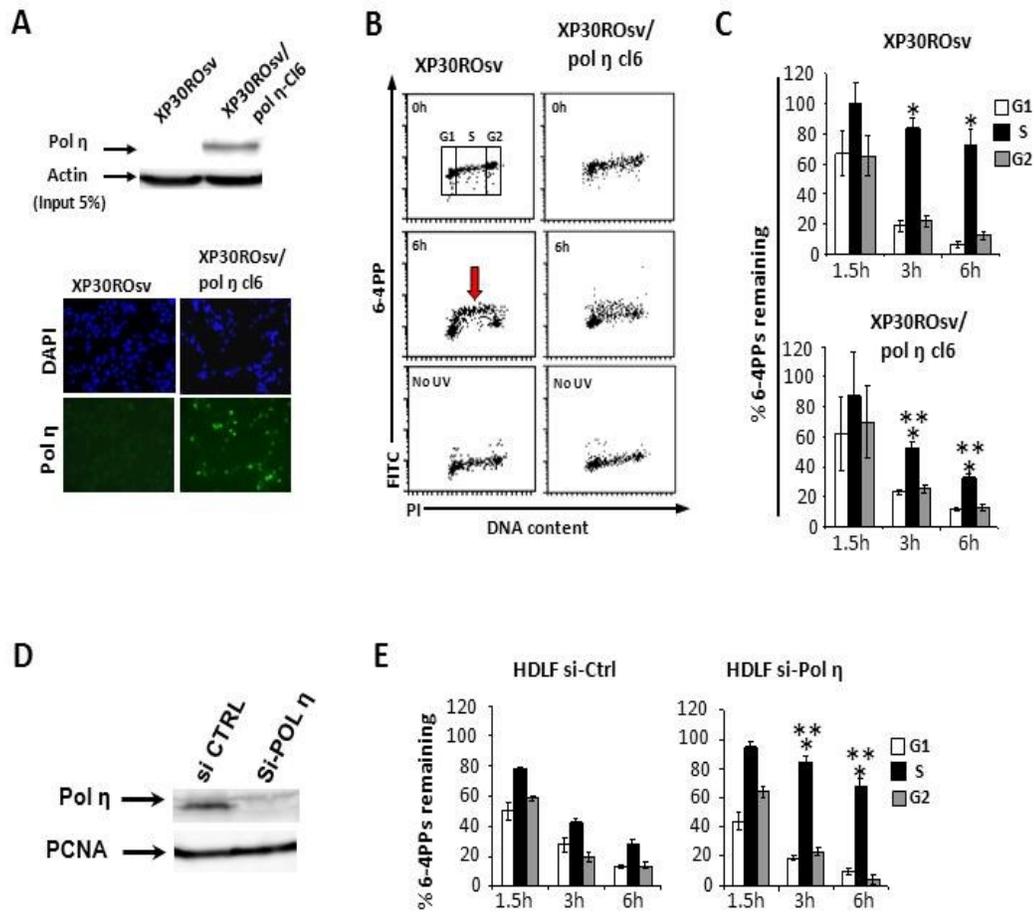
Ces deux approches, par restauration de la fonction Pol  $\eta$  et de l'élimination de sa fonction par ARNsi, devraient confirmer un effet spécifique de sa fonction sur l'efficacité du GGNER en phase S.

Tel qu'il pouvait être prévu, et en accord avec les résultats précédents, les cellules XP30ROsv montrent une inhibition de la réparation des 6-4PP en phase S seulement, comme montré dans la **Figure II.3A-B**. La restauration stable de la fonction Pol  $\eta$  par surexpression de son ADNc dans les cellules XPV (XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6) inverse l'effet observé en absence

de complémentation et montre une réduction de défaut SPR des 6-4PP. En effet, la restauration de l'expression de Pol  $\eta$  Wt montre une restauration des niveaux de réparation des 6-4PP et permet de réduire le défaut SPR de presque 50 % à 6 h post-UV (**Figure II.3A-C**). Toutefois, il est intéressant de constater que cette restauration n'est que partielle, si les cellules GM01652B sont comparées avec les cellules XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6. Il reste approximativement encore 40 % des 6-4PP qui ne sont pas réparés à 6 h post UV (**Figure II.3C**). Il est clair que la surexpression stable de Pol  $\eta$  dans des cellules XP-V permet de restaurer l'efficacité de réparation GGNER des 6-4PP en phase S.

Contrairement à la surexpression de Pol  $\eta$ , l'abrogation spécifique de son expression endogène, par utilisation d'ARNsi, dans les fibroblastes primaires de poumons (HDLF), entraîne un défaut de la réparation GGNER des 6-4PP induits par une dose de 15 J/m<sup>2</sup> et tel que décrit à la **Figure II.3D-E**. Contrairement à l'ARNsi Pol  $\eta$ , l'expression de l'ARNsi contrôle (si-Ctrl), non spécifique et de séquence aléatoire, n'exerce aucune inhibition de l'expression Pol  $\eta$  (**Figure II.3D**) et aucun effet notable sur la réparation SPR des 6-4PP, tel que représenté graphiquement à la **Figure II.3E**. Les distributions représentatives brutes sont illustrées en Annexe à la **Figure Supp.II.1B**. Cet effet de l'ARNsi Pol  $\eta$  suggère que l'abrogation endogène de la fonction Pol  $\eta$  entraîne un défaut SPR des dommages aux UV.

Dans tous les cas de figures examinés, en absence ou en présence de Pol  $\eta$ , l'efficacité de réparation GGNER en phase G0/G0 et G2/M reste inchangée, alors que son absence entraîne un défaut prononcé de cette réparation en phase S seulement. Les résultats obtenus pour les phases G0/G1 et G2/M sont en accord complet avec ceux obtenus précédemment, suggérant que les cellules XP-V présentent une réparation NER normale. Ces résultats soulignent donc une importance fonctionnelle de Pol  $\eta$ , qui n'a jamais été rapportée avant, pour la réparation SPR. De plus, conformément à ce qui a été rapporté, la perte de la fonction Pol  $\eta$  peut être facilement restaurée par surexpression de cette dernière, et que cette restauration rétablie, à priori, partiellement l'efficacité de réparation SPR des 6-4PP dans les cellules XP-V.



**Figure II.3:** La déficience de réparation GGNER des photo-dommages UV est attribuable à une perte fonctionnelle de l'ADN polymérase  $\eta$ .

**A.** Détection de Pol  $\eta$  dans les cellules transformées au SV40, XP-V (XP30ROsv) et XP-V complétées de façon stable avec Pol  $\eta$  (XP30ROsv- Pol  $\eta$ /cl6), par immuno-precipitation suivie d'une détection par immuno-buvardage. En dessous, détection de Pol  $\eta$  par immuno-fluorescence. **B.** Distribution à 2 variables 6-4PP (FITC) contre le contenu ADN (PI) des cellules XP30ROsv et XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6 exposées à 15 J/m<sup>2</sup>. La flèche rouge indique le défaut de réparation constaté en phase S dans les cellules XP30ROsv- Pol  $\eta$ /cl6. **C.** Représentation graphique de la réparation GGNER des 6-4PP en fonction du cycle cellulaire après une irradiation UV de 15 J/m<sup>2</sup>. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réparation relatif à t=0, et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  S.E, \*p<0.05, indique une différence significative de la phase S relative à la phase G1 (test t-student bilatéral). **D.** Détection de Pol  $\eta$  dans les cellules HDLF, transfectées transitoirement par l'ARNsi contrôle (si-CTRL) ou l'ARNsi spécifique pour Pol  $\eta$  (si-POL  $\eta$ ). **E.** Représentation graphique de la réparation 6-4PP en fonction du cycle cellulaire dans les cellules HDLF (ou LL), exposées à 15 J/m<sup>2</sup> UV, exprimant soit l'ARNsi contrôle ou soit l'ARNsi -Pol  $\eta$ . Les résultats sont exprimés en pourcentage de réparation relatif à t=0, et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  S.E, \*p<0.05, indique une différence significative de la phase S relative à la phase G1 (test t-student bilatéral), \*\* p<0.05, différence significative entre les HDLF si-CTRL et HDLF si-POL  $\eta$  (test t-student bilatéral).

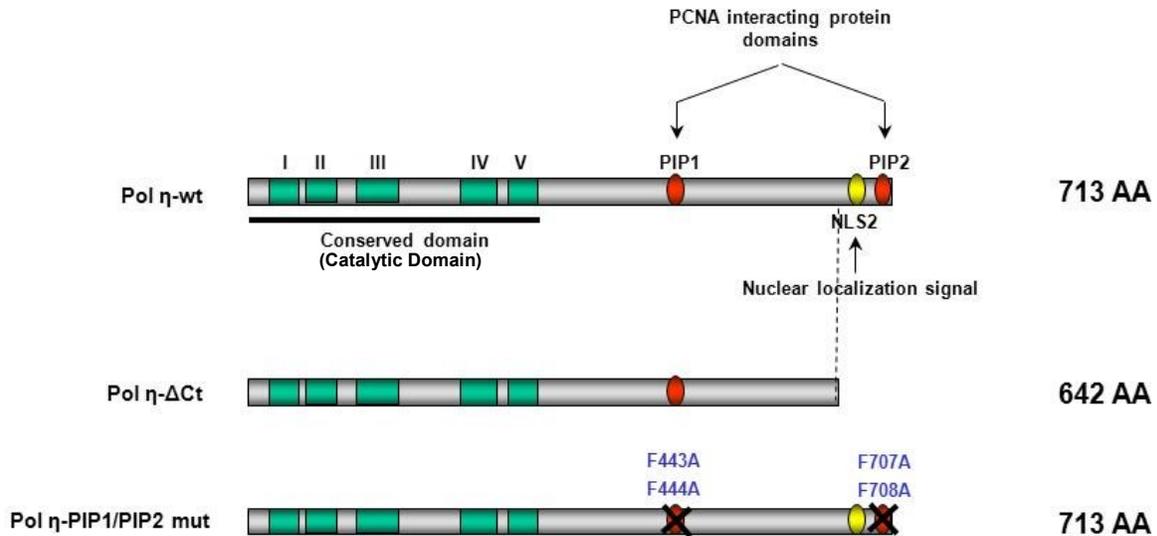
#### II.4.3 La localisation nucléaire Pol $\eta$ , la formation de foyers et sa liaison à PCNA semblent nécessaires à une réparation SPR efficace dans les cellules humaines

A la lumière des résultats précédents et de la nécessité de l'expression fonctionnelle de Pol  $\eta$  pour la réparation SPR, il a été décidé d'étudier différents mutants Pol  $\eta$  dans les cellules XP30ROsv, dans le but d'élucider la base du ou des mécanisme(s) impliqué(s) dans ce nouveau rôle de Pol  $\eta$ . Pour cela, nous avons réalisé différentes fusions Pol  $\eta$  avec la protéine fluorescente EGFP, placée à l'extrémité N-terminale de Pol  $\eta$ . Les mutants réalisés sont déjà connus pour leur déficience fonctionnelle, tels que le mutant EGFP-Pol  $\eta$ - $\Delta$ Ct, où Pol  $\eta$  est tronquée à l'extrémité C-terminale, éliminant son signal de localisation nucléaire (NLS) et aussi le mutant EGFP-Pol  $\eta$ -PIP1/2, où les domaines d'interaction PIP1 et PIP2, avec PCNA, ont été mutés dans le but d'empêcher la présence ou l'accumulation de Pol  $\eta$  aux foyers de réplication avec PCNA (Acharya et al., 2008). Ces mutants, incluant la forme sauvage EGFP-Pol  $\eta$ -Wt, sont exprimés stablement dans les cellules XP30ROsv (**Figure II.4** et **Figure II.5A**) et ont été d'abord testés pour leurs caractéristiques fonctionnelles avant de procéder à leur analyse de réparation SPR en fonction du cycle.

Le mutant EGFP-Pol  $\eta$ - $\Delta$ Ct montre une localisation nucléaire et aussi cytoplasmique, conformément à ce qui a été rapporté (Kannouche et al., 2001), alors que la forme sauvage EGFP-Pol  $\eta$ -Wt et le mutant EGFP-Pol  $\eta$ -PIP1/2 démontrent une localisation cellulaire exclusivement nucléaire (**Figure II.5B**) (Acharya et al., 2008; Kannouche et al., 2001). De plus, pour ce dernier mutant, il est clairement observé une incapacité pour celui-ci de former des foyers nucléaires après 15 J/m<sup>2</sup> UV mais aussi en absence d'UV tel que montré par quantification automatique des foyers nucléaires dans les cellules XP30ROsv-EGFP-Pol  $\eta$ -Wt et les cellules XPR30sv-EGFP-Pol  $\eta$ -PIP1/2 vivantes en temps réel (**Figure II.5C**).

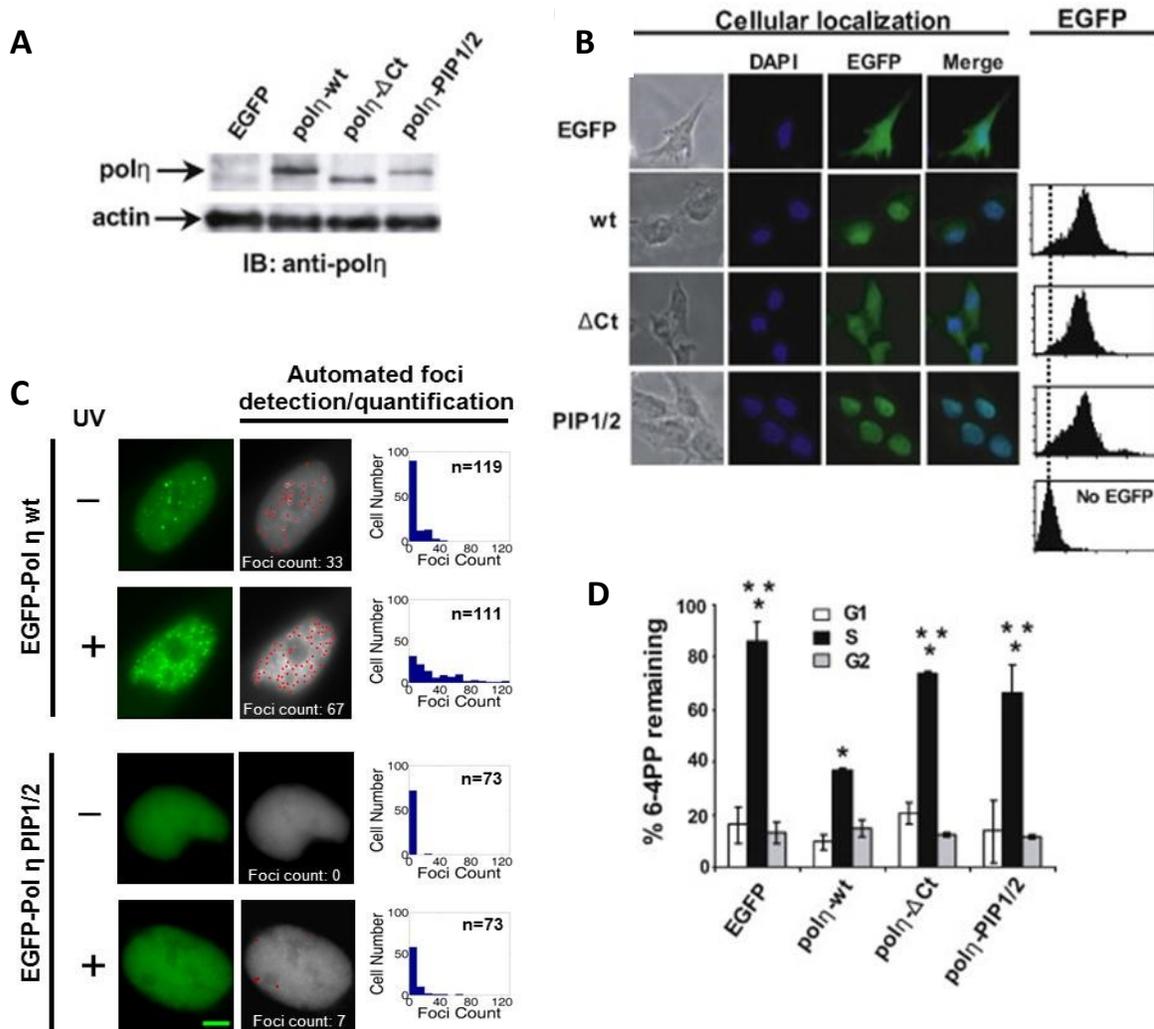
Les observations précédentes confirment la particularité fonctionnelle de chacun des mutants et valident leur utilisation subséquente pour l'analyse SPR des 6-4PP. En effet, tel que présenté à la **Figure II.5D**, l'analyse de la réparation GGNER des 6-4PP dans ces lignées cellulaires, démontre que contrairement aux cellules XP30ROsv exprimant la forme sauvage EGFP-Pol  $\eta$ -Wt, celles exprimant le mutant EGFP-Pol  $\eta$ - $\Delta$ Ct ou le mutant EGFP-Pol  $\eta$ -PIP1/2, montrent indéniablement un défaut de réparation SPR au même titre que les cellules XP30ROsv exprimant simplement l'EGFP. Enfin, l'ensemble des résultats présentés à la

**Figure II.5** indique d'une part que la restauration stable de la fonction Pol  $\eta$  avec la forme EGFP-Pol  $\eta$ -Wt permet d'inverser le défaut SPR (tout comme la lignée cellulaire XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6) et d'autre part que l'intégrité de la localisation nucléaire Pol  $\eta$  et que ses interactions avec PCNA aux foyers, sont nécessaires à une réparation GGNER efficace en phase S dans les cellules humaines.



**Figure II.4:** Représentation schématique de la forme Pol  $\eta$ -Wt et des mutants Pol  $\eta$ - $\Delta$ Ct et Pol  $\eta$ -PIP1/2 fusionnées à l'EGFP.

Le mutant EGFP-Pol  $\eta$ - $\Delta$ Ct correspond à une délétion de 71 résidus à partir de l'extrémité C-terminale de Pol  $\eta$ -Wt. Le mutant EGFP- Pol  $\eta$ -PIP1/2 possède des domaines PIP (domaine d'interaction avec PCNA) qui ne sont pas capables de lier PCNA grâce à l'introduction des mutations F443A et F444A dans le domaine PIP1 et F707A et F708A dans le domaine PIP2.



**Figure II.5:** Analyse des cellules XP30ROsv exprimant de façon stable les mutants fusionnés EGFP- Pol η.

**A.** Détection de Pol η dans les cellules XP30ROsv exprimant de façon stable la forme sauvage EGFP-Pol η-Wt ou les mutants EGFP-Pol η-ΔCt et EGFP-Pol η-PIP1/2 par immuno-précipitation suivie d'une détection par immunobuvardage. **B. A gauche,** Localisation cellulaire des variants EGFP- Pol η dans les cellules XP30ROsv tel que montré par l'auto-fluorescence EGFP dans des cellules fixées non exposées aux UV. **A droite,** auto-fluorescence EGFP dans les cellules vivantes. **C.** Quantification automatique des foyers nucléaires Pol η dans les cellules XP30ROsv vivantes exprimant la forme EGFP-Pol η-Wt et le mutant EGFP- Pol η-PIP1/2. Dans chaque condition, les mêmes cellules sont photographiées avant (-) et 1,5 h après (+), une exposition à 15 J/m<sup>2</sup> UV. Les photographies montrent des noyaux représentatifs utilisés pour la quantification automatique. Les histogrammes de droite indiquent la distribution des comptes de foyers pour le nombre indiqués de cellules (n). **D.** Représentation graphique de la réparation 6-4 PP à 6 h post-UV (15 J/m<sup>2</sup>) dans les cellules XP30ROsv exprimant les variants EGFP- Pol η. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réparation relatif à t=0, et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ± S.E, \*p<0.05, indique une différence significative entre la phase S et la phase G1 des cellules indiquées (test t-student bilatéral); \*\*p<0.05, indique une différence significative entre les phases S des cellules XP30ROsv EGFP-Pol η-Wt et les mutants EGFP- Pol η (test t-student bilatéral).

#### II.4.4 L'abrogation de la réplication de l'ADN, avant une exposition aux UV, élimine le défaut de réparation SPR observé dans les fibroblastes XP-V et ATR-Seckel

La kinase ATR et l'ADN polymérase translésionnelle Pol  $\eta$  semblent donc nécessaire à la réparation GGNER en phase S des 6-4PP et des CPD (Auclair et al., 2008). ATR est connue pour être induite par un stress répliatif, tels que les UV, et compte tenu du rôle de celle-ci et de Pol  $\eta$  dans la maintenance des fourches de réplication et aussi dans le point de contrôle S après une exposition aux UV, il est tentant d'envisager un lien entre le stress répliatif et la réparation SPR. Autrement dit, il est proposé de tester l'effet de la réduction du nombre de fourches de réplication en phase S au moment de l'exposition UV sur l'efficacité GGNER des 6-4PP. Dans cet objectif, les cellules XP30ROsv et XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6 ont été traitées avec des inhibiteurs de la réplication avant l'irradiation 15 J/m<sup>2</sup> UV. Brièvement, ces cellules ont été traitées avec 15  $\mu$ g/mL d'aphidicoline (Aph) ou 10 mM d'hydroxyurée (HU). Ces inhibiteurs de la réplication, comme illustré à la **Figure II.6A**, exercent une forte inhibition sur la synthèse d'ADN tel qu'indiqué par les profils d'incorporation BrdU en chasse dans les cellules XP30ROsv et XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6, et aussi par la quantification de la synthèse d'ADN. Etonnamment, l'inhibition de la réplication de l'ADN de ces cellules avant l'exposition aux UV, élimine complètement le défaut SPR observé auparavant, en absence de ces inhibiteurs (**Figure II.6B**). En effet, le défaut SPR des 6-4PP est drastiquement réduit voir éliminé par traitements avec l'aphidicoline ou l'hydroxyurée avant UV, comme le montrent les profils de réparation 6-4PP à 6 h post-UV. Il est même observé une amélioration de la réparation dans les cellules SPR restaurées XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6 traitées avec l'aphidicoline, comme représenté graphiquement dans la **Figure II.6B**.

Compte-tenu de ces résultats surprenants, il est légitime de penser que ces inhibiteurs peuvent exercer le même effet que celui observé, mais cette fois dans les cellules ATR-Seckel F02-98 (Auclair et al., 2008), et qui ont déjà été utilisées comme contrôle négatif de défaut SPR (**Figure II.2**). Tel que montré à la **Figure II.6C-D**, des effets similaires à ceux obtenus dans les cellules XP30ROsv sont observés dans les cellules F02-98 après une inhibition efficace de la synthèse d'ADN par l'aphidicoline avant UV (**Figure II.6C**).

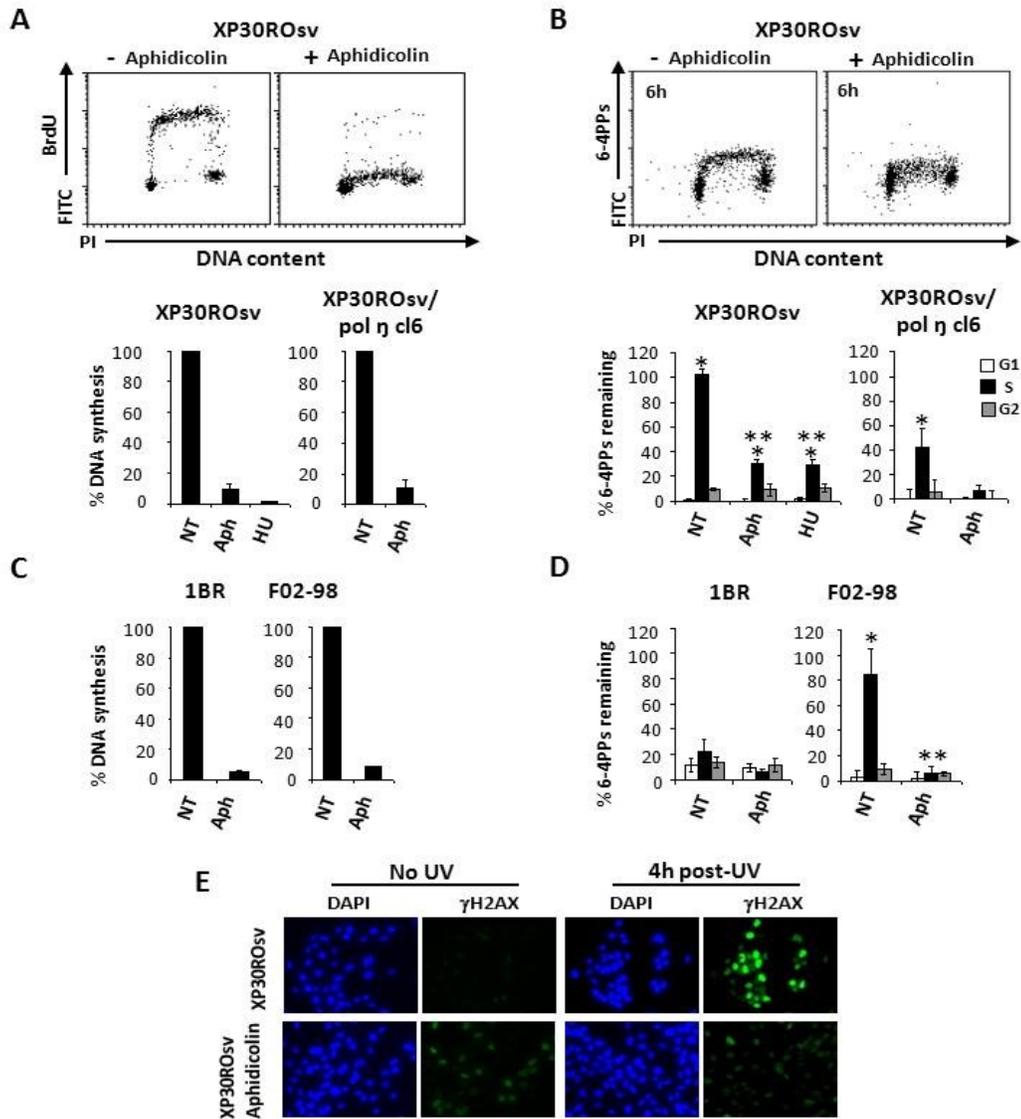
En effet, ici aussi, le défaut de réparation GGNER en phase S des 6-4PP est totalement éliminé dans ces cellules ATR-Seckel traitées avec 15  $\mu$ g/mL d'aphidicoline. Tout comme les

cellules XP30ROsv et XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6, il n'existe plus aucune différence dans la réparation en phase S entre les cellules SPR efficace 1BR et les cellules F02-98. De plus, de façon identique aux cellules XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6, les cellules 1BR exhibent une réparation GGNER en phase S plus efficace qu'en l'absence de l'inhibiteur de la synthèse d'ADN.

L'ensemble de ces données présentées à la **Figure II.6**, montrent qu'une abrogation de la synthèse d'ADN avant l'exposition aux UV, exerce un effet important sur la réparation GGNER, et conduit, même en absence de défauts de réparation, à une réparation SPR plus efficace, comme il est suggéré avec les lignées normales, XP-V et ATR-Seckel. Ces résultats indiquent donc un lien clair entre le stress réplcatif et le défaut SPR. En effet, l'action des inhibiteurs de la réplication entraîne une diminution drastique du niveau de stress réplcatif qui pourrait être généré au moment de l'exposition UV, comme cela est suggéré par la détection de  $\gamma$ H2AX par immunofluorescence (**Figure II.6E**). Il existe donc un mécanisme d'inhibition de l'activité GGNER relié au niveau du stress réplcatif et donc au point de contrôle S.

#### II.4.5 Le défaut de réparation en phase S n'est plus observé par la réduction des niveaux de dommages induits par les UV

Pour analyser la réparation GGNER, basée sur la cytométrie en flux, de la façon la plus fiable possible, il est nécessaire d'exposer les cellules humaines à des doses d'au moins 10 à 20 J/m<sup>2</sup>, afin d'obtenir d'assez bon niveaux de détection des CPD et aussi des 6-4PP, qui sont de fréquences plus rares. Ces doses modérées d'UV sont nécessaires, aussi, pour obtenir une bonne dispersion des « pics » de réparation aux temps post-UV choisis. Cette considération de dose UV est primordiale pour la qualité de la cinétique de réparation obtenue et pour son analyse subséquente. Il est, de plus, connu qu'une variation des doses UV entraîne des variations dans l'efficacité de réparation. Par exemple, l'induction de hauts niveaux de CPD (dose UVC 40-60 J/m<sup>2</sup>) entraîneront une saturation du GGNER et une ralentissement de la cinétique de réparation (Wright et al., 1990).



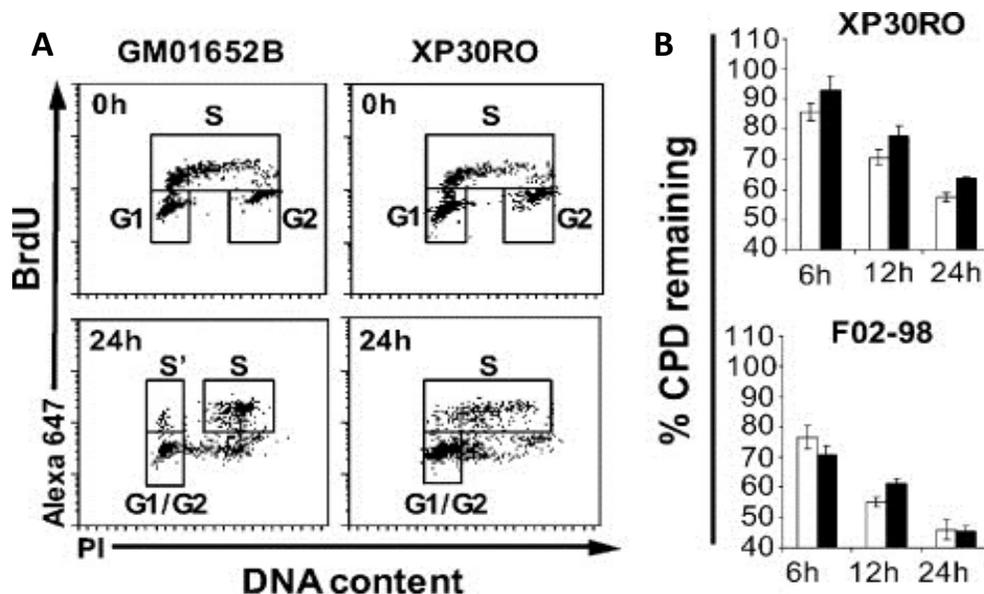
**Figure II.6:** Le défaut de réparation GGNER observé dans les cellules XP-V est abrogé par l'inhibition de la réplication de l'ADN avant une exposition UV de 15 J/m<sup>2</sup> UV.

**A. En haut**, distributions à 2 variables de l'incorporation BrdU dans les cellules XP30ROsv, prétraitées ou non avec l'inhibiteur de réplication aphidicoline. **En bas**, représentation graphique de l'inhibition de la synthèse d'ADN dans les cellules XP30ROsv et les cellules XP30ROsv-Pol η/cl6, prétraitées ou avec l'hydroxyuree (HU) ou l'aphidicoline (Aph). NT, indique les cellules non traitées aux inhibiteurs. **B. En haut**, distributions à 2 variables de la réparation 6-4PP (FITC) en fonction du contenu ADN des cellules XP30ROsv t XP30ROsv-Polη/cl6 prétraitées ou non par l'aphidicoline et visualisée à 6 h après une exposition de 15 J/m<sup>2</sup> UV. **En bas**, représentation graphique de la réparation de 6-4PP en fonction du cycle cellulaire à 6 h post UV dans les cellules XP30ROsv et XP30ROsv-Polη/cl6 prétraitées ou non par l'aphidicoline ou l'hydroxyuree (HU). Les résultats sont exprimés de la même façon qu'en A. **C.** Représentation graphique de l'inhibition de la synthèse d'ADN par l'aphidicoline dans les fibroblastes hTERT immortalisés normaux (1BR) et ATR-seckel (F02-98). L'inhibition de synthèse est exprimée en pourcentage relatif aux cellules non traitées avec l'aphidicoline. **D.** Représentation graphique de la réparation des 6-4PP en fonction du cycle cellulaire dans les cellules 1BR ou F02-98 prétraitées ou non avec l'aphidicoline. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ±SE. \*p<0.05, indique une différence significative entre la phase S relative à la phase la phase G1. \*\*<p0.05, indique une différence significative entre la phase S prétraitée avec l'aphidicoline (Aph) relative à la phase S des cellules non pré-traitées. (NT). **E.** Détection de γH2AX dans les cellules XP30Rosv traitées ou non avec l'aphidicoline et exposées ou non 15 J/m<sup>2</sup> UV par immunofluorescence.

Néanmoins, à la lumière des résultats obtenus avec l'aphidicoline et l'hydroxyurée, il est à présent nécessaire de savoir si une exposition à de faibles doses UV ( $5 \text{ J/m}^2$ ) réduit le défaut SPR observé avec  $15 \text{ J/m}^2$ .

Cependant, l'application d'une faible dose UV tel que  $5 \text{ J/m}^2$  rend difficile l'analyse de la réparation des 6-4PP avec la méthode de réparation NER cytométrique. Une réparation fiable ne peut être envisagée qu'avec les CPD, de niveaux assez fréquents pour être détectés, à cette dose. Tout comme précédemment, l'utilisation du triple marquage BrdU/CPD/PI, permettra tout de même, d'évaluer de façon certaine la réparation CPD jusqu'à 24 h post UV ( $5 \text{ J/m}^2$ ) dans cellules primaires XP-V (XP30RO) (**Figure II.7**). En effet, contrairement à ce qui est illustré dans la **Figure II.2A**, avec cette faible dose UV, les cellules XP30RO primaires montrent un arrêt du cycle cellulaire G1/G0 plus important que celui observé dans les cellules normales. Ces dernières ont déjà beaucoup plus progressées dans les différentes phases du cycle cellulaires 24 h après UV, et ne permettront une analyse fiable seulement à 12 h post-UV (données non-montrées), ce qui est un peu court pour établir une cinétique fiable de réparation des CPD. Néanmoins les cellules XP-V (XP30RO) et ATR-Seckel (F02-98), sont profondément affectées dans leur progression en phase S suite à l'induction de dommages à cette dose UV, ce qui permettra tout de même une analyse de la réparation à 24 h post UV dans ces cellules seulement.

En accord avec les résultats précédent, l'application, d'une dose de  $5 \text{ J/m}^2$  ne permet plus d'observer un défaut de la réparation GGNER des CPD en phase S dans les cellules XP-V et ATR-Seckel (déficientes en réparation SPR avec une dose de  $15 \text{ J/m}^2$ ). Ces données démontrent qu'une diminution notable des niveaux de dommages induits en phase S entraîne une augmentation de l'efficacité de réparation des CPD dans cette même phase. Ces résultats renforcent donc la notion de l'existence d'un seuil de dommages ou de stress réplicatif à franchir pour inhiber considérablement l'activité GGNER. Ce seuil pourrait donc moduler le défaut de réparation SPR observé dans les cellules XP-V et ATR-Seckel. Globalement, l'ensemble des données suppose un lien entre le stress réplicatif et/ou le point de contrôle S avec la réparation par excision de nucléotides pendant la réplication de l'ADN et qu'un seuil de stress ou de signalisation doit être franchit pour l'exécution d'un tel mécanisme répressur.



**Figure II.7:** La réparation GGNER en phase S est normale dans les cellules primaires XP-V et hTERT- immortalisées ATR-Seckel après une exposition à 5 J/m<sup>2</sup> UV.

**A.** Distribution à 2 variables de l'incorporation BrdU en fonction du contenu ADN des cellules primaires normales (GM01652B) et XP-V (XP30RO). **B.** Représentation graphique de la réparation ADN GGNER des CPD dans les cellules primaires XP-V (XP30RO) et ATR-Seckel (F02-98) exposées à 5 J/m<sup>2</sup> UV. Cependant à 5 J/m<sup>2</sup> UV, les cellules en phase G2/M se divisent plutôt rapidement et se mélangent avec les cellules qui étaient initialement en phase G1, et ne pourront donc être analysées séparément. Les cellules GM01652B avec cette même dose UV, ne peuvent être suivies pour leur réparation à 24 h post-UV car les cellules en phase S ont déjà traversé la phase G2 et se sont donc divisées. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ± SE.

## II.5 Discussion

Dans cette deuxième partie de thèse, il est montré que les fibroblastes de patients XP-V ont une déficience en réparation GGNER des dommages induits par les UV uniquement en phase S et que cette défaillance SPR est causée par une perte fonctionnelle de Pol  $\eta$ . Ce défaut de réparation visible avec 15 J/m<sup>2</sup>, contredit cependant une étude antérieure dans laquelle la réparation GGNER des 6-4PP a été aussi analysée dans chaque phase du cycle cellulaire, et où, aucune différence de réparation en fonction des phases du cycle cellulaire n'a été constatée

(Mitchell et al., 1995). Néanmoins, les auteurs de cette étude ont utilisé comme méthode de détection l'essai de Radio-immuno-précipitation (RIA) des dommages, où les cellules XP-V (XPPHBE) ont été synchronisées par centrifugation avant le traitement aux UV ( $12 \text{ J/m}^2$ ). Ces conditions d'analyse ne sont donc pas les mêmes que celles utilisées dans cette thèse et soulèvent un problème de pureté de la population cellulaire XPPHBE en phase S. Avec l'approche utilisée en deuxième partie de cette thèse, aucune synchronisation des cellules n'est nécessaire (du moins pour l'analyse des 6-4PP) et l'analyse porte en générale sur 90-95% de pureté pour la population S étudiée, contrairement à l'étude citée précédemment. D'ailleurs, les auteurs rapportent seulement une pureté de 60 % des cellules synchronisées en phase S au moment de l'exposition UV. Les autres populations cellulaires, des autres phases du cycle cellulaire, pourraient diminuer le défaut SPR qui pourrait exister dans ces cellules XP-V, les lymphocytes B, XPPHBE, immortalisées avec les virus d'Eptstein-Barr (EBV). Il est toutefois important de noter que cette lignée cellulaire pourrait être aussi problématique dans cette étude (Mitchell et al., 1995). En effet, la lignée lymphocytaire B, XPPHBE, provient d'un patient XP-V hétérozygote de Pol  $\eta$  où un allèle seulement porte une mutation *framshift* (décalage du cadre de lecture), alors que l'autre allèle porte une mutation inconnue et exprime, tout de même, 20 % des niveaux d'ARNm Pol  $\eta$  observés dans les cellules normales. Il se pourrait donc bien, que même si les niveaux protéiques Pol  $\eta$  sont indétectables par immunobuvardage, ces cellules XPPHBE peuvent quand même exprimer des niveaux faibles de Pol  $\eta$  fonctionnelle (Johnson et al., 1999). Toutes ces raisons pourraient donc expliquer pourquoi les auteurs n'ont pas constaté un défaut SPR important avec une dose de  $12 \text{ J/m}^2$  (Mitchell et al., 1995). De plus, entre nos mains, ces cellules ne présentent qu'un léger défaut de réparation en phase S des 6-4 PP (voir Annexe **Supp.Figure II.1C**). Une autre étude a également rapportée l'absence d'altération de la réparation GGNER en phase S dans des fibroblastes de peau provenant de patients XP-V. Cette différence, bien qu'apparente, avec nos résultats s'explique fort bien par la dose UV appliquée qui fut de  $6 \text{ J/m}^2$  (Wang et al., 1993). Dans l'étude présentée ici, une exposition à  $5 \text{ J/m}^2$  n'induit pas non plus de défaut SPR, ce qui explique et renforce nos résultats de l'effet de la dose UV sur la réparation SPR.

Comme il fut déjà mentionné en introduction, ce n'est pas la première fois qu'une ADN polymérase translésionnelle puisse être impliquée dans l'activité NER (Ogi and Lehmann, 2006). En effet, Pol  $\kappa$  pourrait participer directement à la dernière étape de la

réparation NER où la resynthèse de l'ADN est nécessaire (*Gap filling*). L'analyse de l'activité de resynthèse par la méthode UDS montre que les cellules de souris Pol  $\kappa$  déficientes ont une activité de resynthèse réduite mais non abrogée. De plus, la déficience Pol  $\kappa$  dans les cellules de souris entraîne une diminution du retrait des 6-4PP en plus du défaut de resynthèse alors que sa restauration, ou complémentation, entraîne une augmentation de la réparation de ces dommages et rétablit la cinétique normale de réparation (Ogi and Lehmann, 2006). Dans cette étude, contrairement à nos résultats avec Pol  $\eta$ , cette nécessité de Pol  $\kappa$  dans la resynthèse NER semble concerner principalement les cellules quiescentes, en phase G1/G0. Ces mêmes auteurs viennent d'ailleurs de montrer très récemment que Pol  $\kappa$  est nécessaire à l'activité de resynthèse de l'ADN après l'action du complexe de post-incision. Ces auteurs démontrent la nécessité de l'ubiquitination de PCNA et du domaine UBZ de Pol  $\kappa$  et proposent 2 modèles d'action de l'ubiquitination de PCNA et Pol  $\kappa$  dans l'étape de resynthèse NER. Dans leur premier modèle (incision double), la liaison de Pol  $\kappa$  et de Pol  $\delta$  à PCNA est inhibée, et c'est Pol  $\epsilon$  qui assure majoritairement l'étape de resynthèse, alors que dans l'autre modèle (incision asymétrique), Pol  $\kappa$  sera principalement utilisée pour cette resynthèse, et entre en action avant l'excision complète de la portion d'ADN portant la lésion (Ogi et al., 2010). Ce dernier modèle, explique bien la persistance des dommages 6-4PP, (mesurée par Immuno-dot/slot blot) observée dans les cellules de souris Pol  $\kappa$  déficientes. Il y aurait un ordre séquentiel dans lequel Pol  $\kappa$  resynthétise l'ADN manquant avant l'incision en 3', et cette étape pourrait être nécessaire au retrait complet du 6-4PP ou du dommage (Ogi et al., 2010). A la lumière des résultats présentés ici avec Pol  $\eta$ , il n'est pas possible d'exclure complètement l'existence d'un tel mécanisme ou d'un rôle similaire pour Pol  $\eta$ , spécifiquement pour l'étape de resynthèse en phase S (et indépendamment de son activité translésionnelle). En effet, la méthode de réparation basée sur la cytométrie en flux permet de mesurer directement la présence des dommages UV sur l'ADN et mesure l'activité GGNER mais ne reflète pas l'activité de resynthèse post-incision du NER. La méthode mesure seulement la disparition des dommages. Un défaut à l'étape de resynthèse NER ne sera donc pas visible avec cette technique. Quoiqu'il en soit, il y a de plus en plus d'évidences que les ADN polymérase translésionnelles exercent aussi des fonctions en dehors de la synthèse translésionnelle proprement dite. Ces polymérase spécialisées peuvent en effet moduler directement ou indirectement l'activité de certains systèmes de réparation tels que la

recombinaison homologue mais aussi le GGNER, comme il est suggéré ici, par stimulation de leur action ou de leur efficacité dans un contexte définis (Ogi et al., 2010).

Comme il fut mentionné à plusieurs reprises, la méthode de réparation employée ici a permis, juste avant cette étude, de montrer que la kinase ATR est nécessaire à la réparation des dommages en phase S uniquement (Auclair et al., 2008), tout comme il est observé ici avec Pol  $\eta$  dans les cellules XP-V. La déficience ATR est connue pour entraîner une augmentation importante du stress réplicatif, entre autre caractérisé par une persistance anormale des fourches de réplication, qui peut conduire éventuellement à leur effondrement et à l'induction subséquente de cassures DSB (Friedel et al., 2009), ce qui est aussi le cas pour les cellules de patients XP-V (Limoli et al., 2000).

De plus, il a été aussi récemment rapporté que BRCA1 est nécessaire à la réparation des dommages 6-4PP et CPD en phase S dans des cellules normales, et que celle-ci contrôle le recrutement de Pol  $\eta$  aux sites de dommage (Pathania et al., 2011). D'après ces auteurs, la fonction de BRCA1 consisterait à inhiber la synthèse translésionnelle pour stimuler la réparation NER au niveau des fourches de réplication. Il est difficile d'inclure ce mécanisme de contrôle, proposé, et exercé par BRCA1 dans le modèle suggéré à la **Figure II.8**. Néanmoins, BRCA1 pourrait toutefois stimuler l'excision des dommages et réprimer les événements de synthèse translésionnelle seulement dans des conditions de niveaux faibles de stress réplicatif, lorsque les risques de cassures DSB restent faibles. En accord avec notre modèle, les risques importants de cassures DSB post-UV en phase S, générés par la déficience Pol  $\eta$  ou ATR, ne permettent pas de se rendre compte du contrôle potentiellement exercé par BRCA1 sur la réparation SPR.

L'effet positif de l'inhibition de la réplication, ou de la réduction du niveau des dommages induits, indique fortement que des niveaux élevés de stress réplicatif ou un nombre important de fourches de réplication arrêtées, pourrait inhiber l'activité GGNER en phase S. Les signaux de stress réplicatifs pourraient être détectés par ATR et BRCA1 et relayés par Pol  $\eta$ , pour inhiber la réparation SPR, dont l'issue dépendra de la capacité de ces acteurs à influencer le stress réplicatif. Cette issue pourrait dépendre de l'existence d'un seuil de stress réplicatif, ou de seuil de dommages, qui influence l'efficacité GGNER. De plus, l'arrêt des fourches de réplication (ou stress réplicatif), induit par la présence de dommages, va générer un nombre important de portion d'ADNss, qui une fois recouvert par RPA, sera le signal de

l'activation ATR et du point de contrôle S. Il est donc parfaitement envisageable de penser qu'une limitation de la disponibilité de RPA, qui intervient déjà dans le NER aux étapes de pré- et post-incision, puisse engendrer une défaillance de la réparation GGNER ou empêcher une excision normale des dommages induits par les UV en phase S. Un arrêt de la réparation causé par une déplétion de RPA fut déjà observé pour la réparation des DSB chez la levure (Johnson et al., 2007). De plus, il semble aussi réguler le nombre d'incisions NER dans des cellules non-prolifératives (Overmeer et al., 2011). La participation d'ATR et RPA dans le mécanisme d'inhibition SPR serait donc vraisemblable puisqu'il vient d'être démontré que la voie ATR/Chk1 est primordiale pour la reprise de la réplication et la survie cellulaire (Despras et al., 2010). Cette influence des fourches de réplication arrêtées font d'ATR et Pol  $\eta$ , des joueurs importants dans la réparation SPR normale.

Ce mécanisme de contrôle de la réparation SPR par le point de contrôle S observé ici, mettant en scène ATR et Pol  $\eta$  pose la question de l'existence d'un lien entre ATR et l'ADN polymérase translésionnelle  $\eta$ . Au moment de la publication des résultats présentés ici, très peu de liens entre ces deux acteurs existaient. Il a néanmoins déjà été montré, dans le passé, que la signalisation ATR est diminuée dans les cellules XPA déficientes alors qu'elle reste intacte dans les autres types de cellules NER déficientes comme XPC, XPF, XPG et CSB. De plus, tel qu'il pouvait être envisagé, la signalisation ATR/Chk1/RPA est augmentée dans les cellules XP-V (Bomgarden et al., 2006; Gohler et al., 2011). Ces résultats montrent donc, d'une part, que la réparation des dommages UV n'est pas nécessaire à l'activation du point de contrôle S, mais indiquent plutôt que XPA joue un rôle important dans la modulation des niveaux de stress réplicatif. En dehors de ces observations, il est possible qu'ATR puisse phosphoryler Pol  $\eta$  sur ses sites S/TQ. Au moment de la publication de résultats présentés ici, l'existence de cette modification post-traductionnelle ajoutée par ATR sur Pol  $\eta$  était encore inconnue. Cependant, quelques mois plus tard, il a été rapporté qu'ATR puisse phosphoryler Pol  $\eta$  en phase S à la serine 601 après une exposition aux UV ( $25 \text{ J/m}^2$ ) et aussi en réponse à divers agents génotoxiques comme la cisplatine et l'hydroxyurée (Gohler et al., 2011). Cette phosphorylation semble faire partie intégrante du point de contrôle S et semble nécessaire au franchissement efficace du CPD, ainsi qu'à la survie cellulaire. Les auteurs proposent un modèle dans lequel la phosphorylation affecte les interactions de Pol  $\eta$  avec PCNA et ses partenaires plutôt qu'une altération directe de son activité catalytique. Toujours dans leur

modèle, la phosphorylation Pol  $\eta$  favoriserait le chargement d'ADN polymérase, de Pol  $\eta$  sur PCNA et stimulerait ainsi l'activité de *bypass* de la lésion, C'est la première fois qu'il est rapporté un lien directe entre le point de contrôle S et l'activité de synthèse translésionnelle. Il faut toutefois signaler que la détection de la phosphorylation de Pol  $\eta$  n'est détectable qu'après application d'une dose importante d'UV (25 J/m<sup>2</sup>). Ces observations et ce modèle s'intègrent bien dans le modèle qui est proposé ici, à la **Figure II.8**, puisque dans celui-ci, la voie ATR peut moduler le franchissement des lésions à l'ADN mais peut aussi, conjointement, moduler la réparation SPR.

Déterminer le mécanisme selon lequel le stress répliatif influence l'activité SPR pourrait s'avérer être une tâche difficile. Il reste encore à identifier l'origine du défaut SPR dans le mécanisme du GGNER, à savoir si le défaut se produit déjà à l'étape de reconnaissance ou plutôt dans les étapes d'incisions. Certes, l'étude de la réparation GGNER en phase S des 6-4PP avec le mutant Pol  $\eta$ -S601A doit encore être réalisée afin de retenir ou exclure l'importance cruciale de cette modification sur la réparation SPR. Malgré cela, l'effet d'ATR sur la réparation SPR pourrait être aussi bien indépendant de Pol  $\eta$  et plutôt contrôler directement l'activité biologique d'un ou plusieurs facteurs NER. Dans ce cas précis, il existe des liens connus et directs entre les facteurs du NER et ATR. Il a déjà été rapporté que la serine 196 du site SQ de XPA, facteur primordial du NER, peut être phosphorylée par ATR (Matsuoka et al., 2007; Shell et al., 2009; Wu et al., 2007; Wu et al., 2006b). Les auteurs montrent en effet qu'ATR est nécessaire à la survie cellulaire post-UV et aussi à l'importation de XPA dans le noyau (Wu et al., 2007), indépendamment de son activité de phosphorylation. De plus, ces mêmes auteurs ont rapporté que cette phosphorylation régule la réparation des CPD et que ce contrôle s'effectue qu'en phase S uniquement (Li et al., 2011a). Ces résultats semblent fournir la clé pour l'élucidation du ou des mécanisme(s) impliqué(s) dans les observations avec Pol  $\eta$ . Cependant, ces résultats, provenant tous du même groupe, sont à prendre avec parcimonie en raison de l'invéraisemblance de certaines cinétiques et des méthodes utilisées. De plus, XPA peut être aussi importé au noyau de façon indépendante à ATR (Li et al., 2011b). Cette importation ATR dépendante de XPA n'a jamais été observée entre mes mains. Ces mêmes auteurs montrent également que dans les cellules HeLa, la réparation en phase S est bien meilleure qu'en phase G1 et aucun effet n'est rapporté sur la réparation de 6-4PP. Ces résultats sont en désaccord avec les résultats présentés ici et ceux

publiés avant (Auclair et al., 2008). L'existence d'un tel mécanisme reste donc à prouver ou à revisiter. Mais il semble tout de même qu'il existe un lien entre XPA et ATR et que cet événement de phosphorylation a aussi été rapporté ailleurs (Lee et al., 2012b; Matsuoka et al., 2007). A savoir si la phosphorylation de la serine 196 régule la réparation GGNER en phase S, cela doit encore être testé avec notre essai de réparation cytométrique utilisé ici.

Grâce à une étude publiée très récemment, il est clair que XPA est une cible de choix pour investiguer le mécanisme de SPR. En effet, il semble que les domaines PIP ne soient pas les seuls domaines à pouvoir interagir avec PCNA, les domaines APIM (AlkB homolog-2 PCNA Interacting Motif), nouvellement identifiés peuvent, eux aussi, établir des interactions avec PCNA (Gilljam et al., 2009; Gilljam et al., 2012). Le facteur XPA semble posséder un Domain APIM lui permettant d'établir une interaction avec le réplisome. Plus exactement, XPA interagit avec PCNA aux foyers de réplication et que cette interaction, peut être annulée par la mutation ponctuelle F164A. Cette annulation, entraîne une diminution de la réparation NER en phase S (Gilljam et al., 2012). Cette diminution de réparation des 6-4PP, démontrée avec l'essai de réparation NER basé sur la cytométrie en flux, suggère très fortement que XPA pourrait assister ou stimuler le recrutement des facteurs du NER au niveau de fourches et à leur proximité et ainsi favoriser la réparation SPR et la reprise de la réplication de l'ADN. Cependant, les auteurs n'abordent pas l'influence de la voie ATR et de la phosphorylation de la serine 196 de XPA dans leur modèle et son implication possible dans les résultats observés (Gilljam et al., 2012). Compte tenu de ces études récentes, et à la lumière des résultats présentés ici, il est proposé un modèle global et simplifié du mécanisme potentiellement responsable de l'inhibition de la réparation SPR causée par une déficience Pol  $\eta$  et ATR, observée dans les cellules XP-V, **Figure II.8**.

Dans les cellules normales, l'induction de dommages en phase S induit un arrêt transitoire des fourches de réplication, immédiatement suivi, de l'activation d'ATR, ce qui favorisera la stabilisation des fourches et la synthèse translésionnelle assurée par Pol  $\eta$ . Cette dernière permettra donc le franchissement des CPD et la reprise de la réplication. La rapidité d'exécution concertée de ces mécanismes moléculaires, permettra l'induction de niveaux contrôlables et gérables de cassures DSB au cours du stress réplicatif. Parallèlement, ATR, dans le modèle qui est proposé, stimulerait l'interaction XPA et PCNA au niveau des fourches

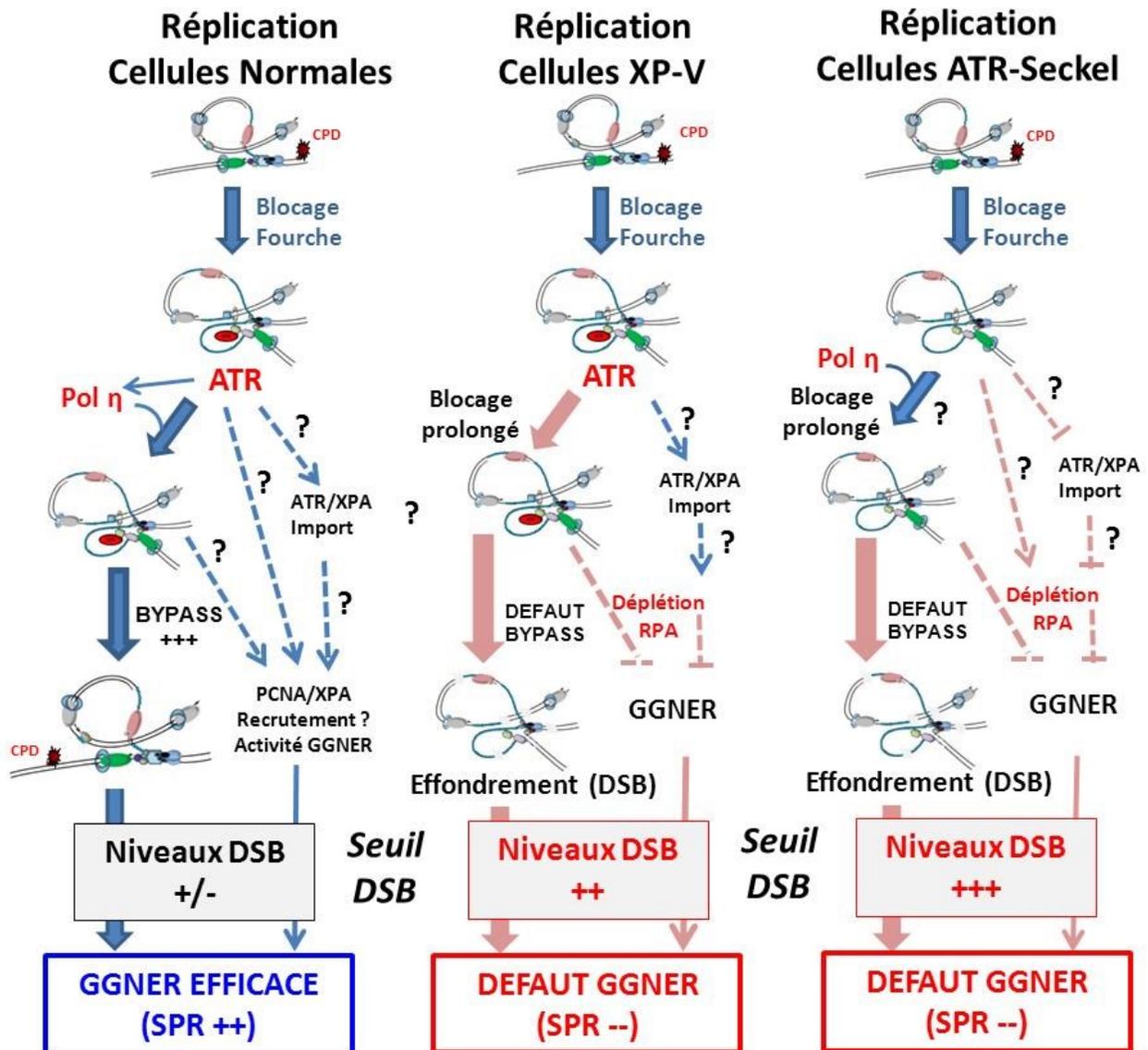
et permettrait donc l'élimination GGNER efficace des dommages dans des régions critiques (pouvant favoriser la génération de DSB) dans le but de réduire le plus possible le stress réplicatif, et ce conjointement à la synthèse translésionnelle. Ce mécanisme resterait toutefois secondaire dans l'effet observé et dans le modèle qui est ici proposé, puisqu'à faible dose UV ( $5 \text{ J/m}^2$ ), les cellules ATR-Seckel réparent les CPD et les 6-4PP.

Dans le cas d'une déficience ATR ou Pol  $\eta$ , il y aura une persistance des fourches de réplication arrêtées, ce qui entraînera une augmentation des portions d'ADNss et du risque d'effondrement de ces fourches si leur persistance se prolonge, augmentant ainsi de beaucoup les niveaux de DSB jusqu'à un seuil intolérable pour assurer la réparation de l'ADN et conduire finalement à une inhibition de l'efficacité du GGNER (par diminution de la disponibilité RPA). De la même façon, et en accord avec les études citées juste avant, si la voie ATR/XPA est compromise, il se produira une forte réduction de la capacité de XPA à se localiser au noyau ou aux fourches de réplication. Cette incapacité de XPA à se lier se traduira finalement par un défaut SPR important. D'ailleurs il se pourrait aussi fort bien que les interactions XPA/PCNA soient augmentées dans les cellules XP-V, comme une sorte de mécanisme protecteur dans un contexte de synthèse translésionnelle fortement compromise. Plus précisément, dans les cellules XP-V, l'effet des DSB (ou stress réplicatif) en phase S serait dominant sur l'efficacité de réparation GGNER exercée par les interactions XPA/PCNA. Bien entendu, ce modèle général proposé doit être vérifié, et permettra de mieux expliquer les rôles de Pol  $\eta$ , ATR et BRCA1 sur la réparation SPR des dommages induits par les UV. De plus PCNA pourrait être lui aussi un acteur majeur de ce mécanisme. En effet, PCNA sert de cargo à Pol  $\eta$  mais aussi à XPA au niveau des fourches et de la dernière étape du NER. PCNA pourrait donc réaliser un pont moléculaire en phase S entre la synthèse translésionnelle et les complexes GGNER.

Quelque soit le(s) mécanisme(s) précis de la modulation GGNER en phase S, dans des conditions excessives de stress réplicatif, l'activité GGNER pourrait ne pas être voulue dans cette phase critique de duplication de l'ADN, en particulier au niveau des fourches de réplication. L'activité d'incision de GGNER pourrait en effet venir considérablement induire des cassures DSB, par conversion de l'ADNss (étape NER de *gap filling*) (Garinis et al., 2005). D'ailleurs, dans la cas des cellules XP-V et ATR-Seckel, la diminution du risque de DSB peut être nécessaire pour favoriser d'autres voies de synthèse

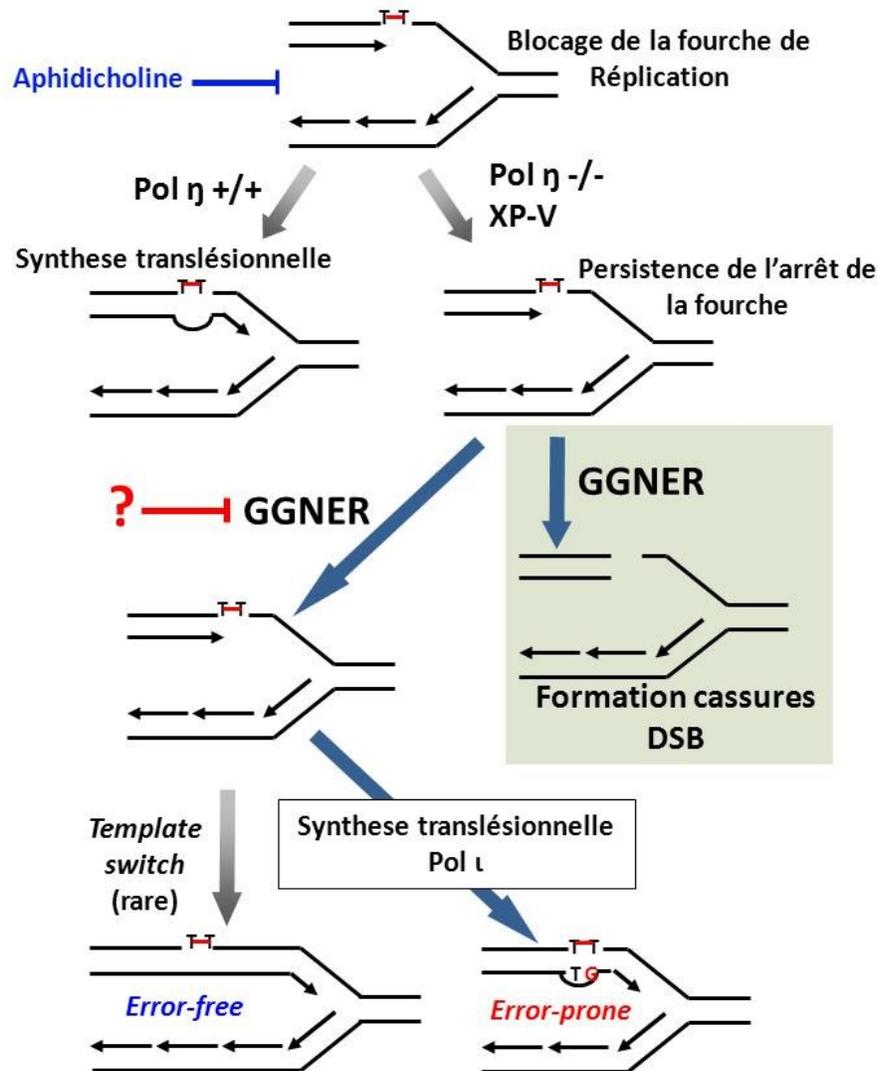
translésionnelle (Pol  $\iota$ ) ou d'autres mécanismes alternatifs de reprise de la réplication comme l'échange de brins matriciels (*template switch*) ou la recombinaison homologe (Branzei and Foiani, 2007; Ziv et al., 2009).

Enfin, en accord avec l'effet positif des inhibiteurs de la réplication sur la réparation SPR et en accord avec le modèle proposé, l'inhibition GGNER observée chez les patients XP-V pourrait finalement être potentiellement protectrice pour la cellule Pol  $\eta$  déficiente et contribuer à augmenter ainsi sa survie grâce aux autres mécanismes de tolérance (par minimisation de la génération de DSB induites par la réparation). Ce contexte pourrait être toutefois être délétère pour l'intégrité génomique et la survie de la cellule normale mais cancéreuse (en dehors d'une déficience unique Pol  $\eta$ ) et permettre aux patients une meilleure rémission. Malgré tout, les conséquences cellulaires et moléculaires de l'inhibition GGNER en phase S n'ont pas été encore évaluées et pourraient là aussi s'avérer difficile à déterminer avec exactitude. Il pourrait être, en effet, compliqué de suivre spécifiquement et avec précision le devenir d'une population cellulaire en phase S. La réparation GGNER normale dans les phases G1/G0 et G2/M pourrait masquer les effets d'un défaut SPR sur l'apoptose et la survie. D'ailleurs, tel que montré ici, les survies clonogéniques des cellules XP-V après UV ne sont que modérément affectées par la déficience XP-V. Pour cette raison, l'inhibition GGNER pendant la phase S pourrait plutôt participer à l'augmentation des mutations, observée chez les individus affectés du syndrome XP-V. A ce stade de l'étude, aucun scénario ne peut être encore privilégié.



**Figure II.8:** Modèle simplifié et préliminaire du contrôle de réparation GGNER en phase S (SPR) dans les cellules humaines normales et dans les cellules SPR déficientes.

Dans les cellules humaines, la présence de CPD va entraîner un stress réplcatif plus ou moins important selon la capacité des cellules à franchir la lésion (*bypass*) et lorsque ce franchissement est efficace, il y aura génération d'un niveau contrôlable de cassures DSB et il permettra la réparation GGNER et la résolution des fourches arrêtées. Ce mécanisme et le contrôle des DSB sont assurés par ATR et par l'activité de *bypass* de Pol η. De façon concomitante au *bypass*, ATR stimule le recrutement de XPA à PCNA qui permettra le recrutement des complexes NER et l'excision du CPD. Il se peut que l'activité efficace de *bypass* puisse réguler aussi le recrutement PCNA/XPA, et ne permettre ce dernier que lorsque le *bypass* est efficace, mais cela reste à encore démontrer. Dans les cas de XP-V et ATR-Seckel, la persistance des fourches de réplcation induite par la déficience Pol η ou l'effondrement induit par la déficience ATR entrainera une génération beaucoup plus importante des cassures DSB en phase S, qui dépasseront le seuil toléré par la cellule, et conduire ainsi à une inhibition prolongée du GGNER dans le but de maintenir le plus possible des niveaux bas de DSB. Il est très vraisemblable que le GGNER pourrait être inhibé par une déplétion importante de RPA. Les flèches pointillées indiquent les étapes restantes encore à vérifier.



**Figure II.9:** Modèle hypothétique du rôle protecteur de l'inhibition de l'activité GGNER dans les cellules XP-V ou Pol η déficientes: Rôle potentiel du stress réplcatif et du point de contrôle S.

Suite à l'induction de dommages UV en phase S, l'absence d'un *bypass* efficace des CPD conduira à l'augmentation du risque de génération de cassures DSB. Pour permettre à la cellule de procéder à la résolution du blocage des fourches et du franchissement de la lésion par les systèmes alternatifs, ce risque doit donc être maintenu à des niveaux faibles et acceptables. Des activités de réparation de l'ADN en dehors des fourches de réplication ne seront donc pas souhaitables. Il est donc logique que l'activité GGNER soit inhibée pour contribuer au maintien des cassures DSB à des niveaux raisonnables.

**CONCLUSION GENERALE**  
**ET**  
**PERSPECTIVES**

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Les UV ont certainement été les rayonnements ou agents de dommages les plus étudiés en raison de leur importance environnementale et dans la biologie de l'évolution. L'induction de dommages UV dans les cellules humaines, est certainement le modèle le plus étudié dans la compréhension de la réponse cellulaire évoquée et de ses conséquences biologiques. Cette réponse cellulaire aux UV permet à la cellule de gérer le mieux possible la présence de photo-dommages génotoxiques comme les CPD et les 6-4PP, et ainsi éviter la génération d'instabilités chromosomiques pouvant conduire au cancer. Cette réponse relativement complexe, faisant intervenir de nombreux systèmes ou mécanismes moléculaires, souvent de façon concertée, permettra à la cellule de tolérer et de s'adapter à la présence de ces dommages. La convergence de signaux d'origine membranaire avec ceux provenant du noyau (induits par la présence des dommages) vont rendre possible la coordination des points de contrôles de la progression cellulaire pour établir la réponse cellulaire appropriée à savoir la survie ou la mort cellulaire. Selon les résultats présentés dans cette thèse, il semble qu'en dépit du rôle important des voies MAPK (JNK1/2, ERK1/2 et p38 $\alpha/\beta$ ) dans la réponse UV d'origine membranaire, ces dernières ne contrôlent pas l'efficacité d'excision des CPD et des 6-4PP, suite à une exposition aux UV. En revanche, les résultats démontrent ici la nécessité fonctionnelle de l'ADN polymérase translésionnelle Pol  $\eta$ , faisant partie de la réponse de tolérance des dommages d'origine nucléaire, dans la réparation GGNER des CPD et des 6-4PP uniquement en phase S du cycle cellulaire. Il serait, cependant, prématuré et erroné d'exclure complètement une participation des voies MAPK, d'origine membranaire et de retenir seulement les voies de signalisation d'origine nucléaire, représentées par ATR, et indirectement la polymérase Pol  $\eta$ , comme étant seules, essentielles et actives dans le contrôle de la réparation GGNER en phase S. En effet, l'étude du rôle des voies MAPK sur l'efficacité du GGNER a été effectuée que dans des cellules humaines confluentes ou synchronisées en phase G1 alors que l'implication de Pol  $\eta$  ou de la kinase ATR dans la réparation GGNER a été analysée en fonction de chaque phase du cycle cellulaire (Auclair et al., 2008; Auclair et al., 2009). Par conséquent, il est encore incertain si les voies MAPK peuvent exercer un contrôle sur la réparation GGNER en phase S et/ou même en phase G2

spécifiquement. De plus, au cours des dernières années, certaines études suggèrent un lien entre les voies MAPK et ATR, et plus récemment avec Pol  $\eta$  (Barkley et al., 2012; Wei et al., 2011; Wu et al., 2006a). En effet, il a été rapporté que l'inhibition de la voie ERK affecte la redistribution d'ATR du cytosol vers le noyau et diminue l'activation d'ATR après traitement avec l'hydroxyurée. La voie ERK1/2 faciliterait donc l'activation d'ATR (Wu et al., 2006a). Ces mêmes auteurs ont ensuite suggéré que les MAPK ERK1 et ERK2 favoriseraient le recrutement d'ATR aux fourches de réplication dans les cellules humaines MCF-7 (Wei et al., 2011). Ces résultats forts intrigants doivent cependant encore être validés avec d'autres agents de dommages comme les UV. De plus, cette influence des voies MAPK sur le point de contrôle S ne se limiterait pas seulement à la voie ERK1/2 mais pourrait aussi impliquer la voie JNK1/2 (Barkley et al., 2012). Plus exactement, une étude récente démontre que l'ubiquitine ligase de Pol  $\eta$ , RAD18, est un substrat de la voie JNK1/2 et que sa phosphorylation pourrait stimuler son interaction avec Pol  $\eta$ , dans le but de faciliter le recrutement de Pol  $\eta$  à PCNA aux fourches de réplication. Ces études établiraient donc un lien entre les voies JNK1/2 et ERK1/2 et la synthèse translésionnelle (**Figure II.10A**). De plus, ces dernières années, un nombre de plus en plus important d'études montrent une participation des voies MAPK dans la régulation de la réplication et de la réparation post-répllicative (Chen et al., 2010; Day et al., 2010; Miotto and Struhl, 2011). Il serait donc utile de revisiter le rôle des voies MAPK sur l'activité GGNER mais cette fois en fonction du cycle cellulaire, avant d'exclure complètement une influence de ces dernières sur le GGNER. Ces nouvelles fonctions des voies MAPK sur Rad18 et sur l'activation ATR rendent possible un effet positif de leur activité sur la réparation GGNER en phase S (SPR) des CPD et des 6-4PP. C'est pourquoi, les inhibiteurs MAPK utilisés dans cette thèse pourraient être testés pour leur habilité à influencer, voir inhiber, la réparation des dommages UV à l'ADN en phase S et en phase G2/M. Ces tests pourraient évidemment être effectués avec notre méthode de réparation basée sur la cytométrie en flux dans des lignées cellulaires humaines non synchronisées en phase G1/G0. Cette analyse permettra de mettre en évidence, ou non, une participation des voies MAPK sur la réparation GGNER en fonction du cycle cellulaire. Autrement dit, en accord avec les études citées ci-dessus, une diminution de l'activation ATR et du recrutement de Pol  $\eta$  au niveau de fourches, causée par une abrogation de la signalisation MAPK pourrait conduire à des situations similaires à celles observées dans les cellules XP-V et ATR-Seckel.

De plus, compte tenu des effets de la signalisation MAPK sur le cycle cellulaire, il est concevable que l'abrogation des voies MAPK, en phase S, puisse entraîner un stress répliatif pouvant inhiber la réparation GGNER. Si tel est le cas, des précautions devraient donc être prises quant à l'utilisation clinique et/ou thérapeutique des inhibiteurs MAPK. Néanmoins, si l'abrogation des voies MAPK (par simple traitement pharmacologique) diminue le nombre de fourches de réplication avant l'exposition UV, ou contribue à diminuer le stress répliatif, une amélioration de la réparation SPR pourrait être observée dans ce cas précis.

Selon notre modèle, où l'inhibition de la réparation SPR peut être aussi un mécanisme protecteur dont le but est d'éviter une induction importante de cassures DSB, il est séduisant d'envisager qu'une telle inhibition pourrait ne pas se limiter à une inhibition du GGNER mais aussi impliquer ou concerner d'autres systèmes de réparation de l'ADN comme le BER, le MMR ou la réparation des pontages intercaténares (réparation ICL). En effet, la réparation des dommages oxydatifs par le BER augmente de beaucoup les risques de génération de cassures SSB et DSB par les sites abasiques. Il est tout aussi séduisant d'envisager qu'un point de contrôle ou un facteur puisse servir d'interrupteur moléculaire pour autoriser ou non la réparation SPR et être aussi le senseur des niveaux de stress répliatifs. Ce point de contrôle en amont, ou aval, d'ATR devra donc être capable d'intégrer les signaux ATR, et indirectement de Pol  $\eta$  pour ainsi exercer son influence sur la réparation SPR. Ce point de contrôle reste encore à caractériser et pourrait être représenté simplement par ATR lui-même (Auclair et al., 2009; Flynn and Zou, 2011) mais aussi par BRCA1 (Pathania et al., 2011). D'ailleurs, le mode d'activation de la voie ATR/Pol  $\eta$ , à savoir si celle-ci est médiée par ATRIP ou plutôt TopBP1 doit être également démontré (Tomida et al., 2013). Néanmoins, les fonctions BRCA1, dans la promotion de l'excision du dommage UV en phase S et dans la suppression concomitante de la synthèse translésionnelle, telles que rapporté récemment, font de celle-ci un bon candidat pour ce rôle d'interrupteur moléculaire dans le contrôle SPR (Pathania et al., 2011). Cependant, la participation de BRCA1 dans la voie ATR/Pol  $\eta$  doit encore être établie rigoureusement avec notre système d'analyse. Des études fonctionnelles supplémentaires sont donc encore nécessaires pour caractériser les acteurs intervenant dans le contrôle SPR, dépendant de la voie ATR/Pol  $\eta$ .

Certaines cibles de la voie ATR peuvent potentiellement participer au contrôle SPR. La déplétion ou l'abrogation spécifique de ces cibles, en amont et/ou en aval, peuvent être testées avec une méthodologie similaire à celle présentée en dans cette thèse, notamment à l'aide d'inhibiteur pharmacologique pour les kinases et/ou d'ARN interférents, ARNsi. Ces acteurs potentiels de la voie ATR/Pol  $\eta$  peuvent être, comme mentionné, BRCA1 (Pathania et al., 2011; Tibbetts et al., 2000), mais aussi Chk1, Chk2, BLM (Stokes et al., 2007a; Stokes et al., 2007b), le complexe FA (Shigechi et al., 2012; Tomida et al., 2013) et la kinase PLK1/PLX1 (Qin et al., 2013; Trenz et al., 2008; Yoo et al., 2004). En effet, les kinases Chk1, Chk2 et PLK1/PLX1 sont nécessaires à la signalisation ATR et particulièrement au contrôle de la transition G2/M après UV. Par exemple, un effet stimulateur de l'activité Chk1 ou de Chk2 sur la réparation GGNER en phase S mettrait en évidence un mécanisme de *feedback* positif de la stimulation ATR sur cette réparation. D'autre part, l'hélicase BLM, le suppresseur de tumeur BRCA1 et les facteurs du complexe FA, sont également des joueurs très attractifs car ceux-ci participent à la réparation des pontages intercaténaux au niveau de fourche de réplication. D'ailleurs la voie FA semble stimuler la reprise de la réplication en association avec Pol  $\eta$  (Renaud and Rosselli, 2013). L'ensemble des candidats cités peuvent donc potentiellement influencer la réparation SPR, d'une part, en raison de leur rôle important pour la stabilisation de la fourche arrêtée, sa résolution, et la reprise de la réplication, mais aussi d'autre part, pour leur capacité à maintenir des niveaux faibles de stress réplcatifs (**Figure II.10B**).

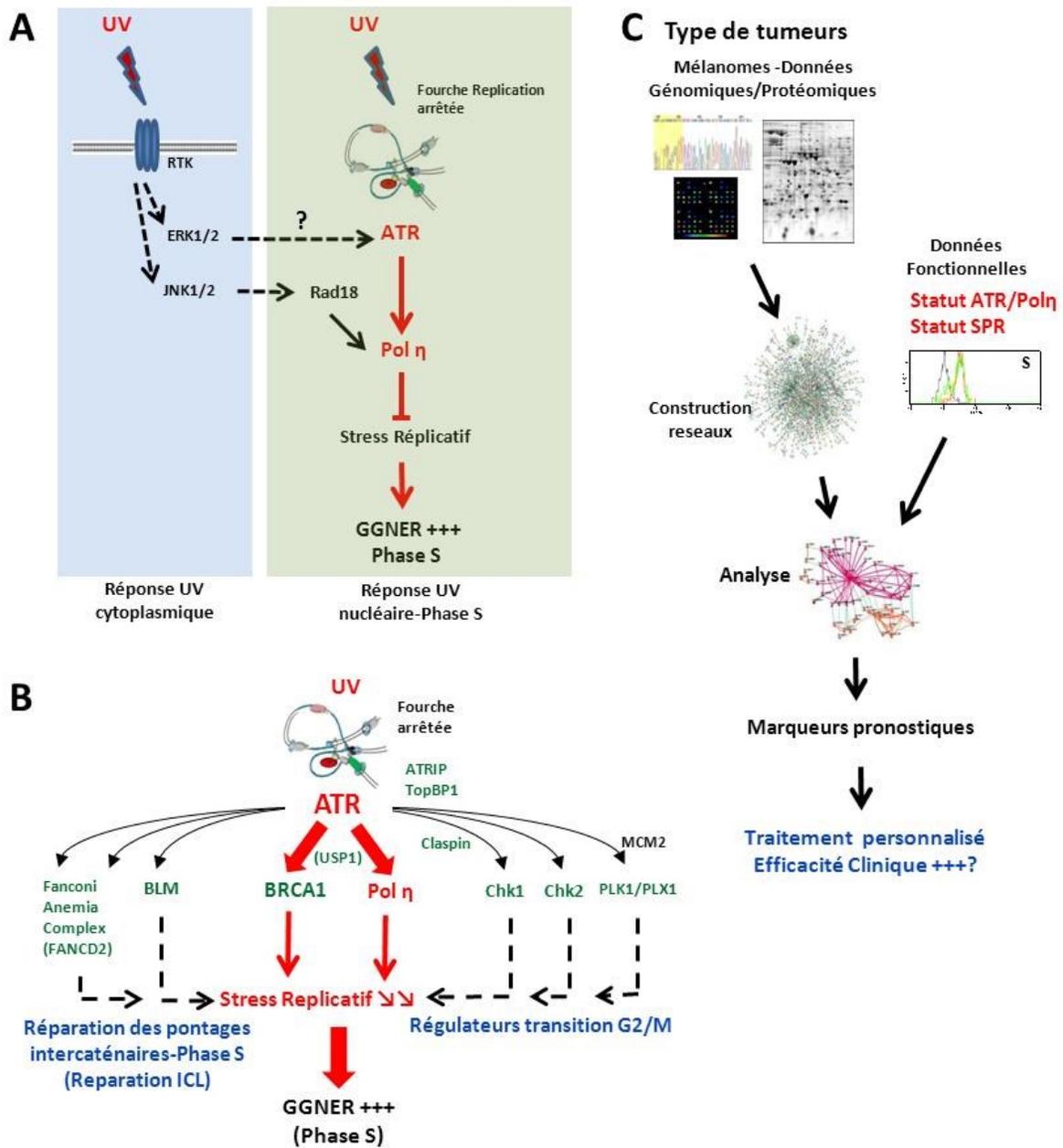
L'ensemble des résultats montrés dans cette thèse revêt une certaine importance, compte tenu du rôle grandissant des voies MAPK et des ADN polymérases dans la biologie du cancer (Chapnick et al., 2011; Lange et al., 2011). Par exemple, l'expression de Pol  $\eta$  est réduite dans les tumeurs du poumon et de l'estomac par rapport aux tissus normaux, et corrèle avec l'agressivité et la survie des patients (Ceppi et al., 2009). De plus, une augmentation de l'expression de Pol  $\beta$ , impliquée dans le BER, est aussi rapportée dans les cancers gastriques, ovariens et utérins (Lange et al., 2011). Le mécanisme d'inhibition SPR induite par la déficience Pol  $\eta$  et ATR, pourrait être impliqué dans certains cancers et même dans la résistance de certaines tumeurs aux agents chimiothérapeutiques. Une réparation SPR déficiente pourrait augmenter l'accumulation de mutations génétiques et donc favoriser la

carcinogénèse pour les cellules normales mais aussi augmenter la résistance aux agents de chimiothérapies pour les cellules cancéreuses. Le statut SPR des tumeurs comme le mélanome, le cancer ovarien, le cancer du poumon pourrait influencer la survie du patient et ainsi permettre une meilleure élaboration de protocoles de chimiothérapies voir la mise en place de traitements du cancer «sur mesure» en fonction du statut SPR et des agents chimiothérapeutiques. Même si actuellement le devenir exacte de ces cellules SPR déficientes après une exposition UV reste encore très obscur, des études de criblages SPR de tumeur doivent être envisagées en association avec la survie du patient à court terme et long terme après la chimiothérapie. Bien évidemment, la caractérisation des évènements moléculaires sous-jacents, impliqués, dans la régulation SPR est d'une importance capitale pour une meilleure compréhension de la tolérance cellulaire aux dommages à l'ADN. C'est pourquoi des approches biologiques des systèmes devraient, à présent, être privilégiées en conjonction avec des approches moléculaires classiques.

La combinaison de techniques mathématiques, informatiques, empiriques et fonctionnelles permettra de mieux comprendre la complexité et la biologie du cancer. Pour mieux comprendre l'impact de ce(s) mécanisme(s) de contrôle SPR, l'analyse génomiques des gènes de différents type de tumeurs par leur séquence d'ADN couplées à l'analyse protéomique (expression et modifications post-traductionnelle des protéines) devraient, à présent, être effectuée afin d'établir des réseaux moléculaires d'interactions et de signalisation de la réponse en phase S aux dommages à l'ADN. Ces données, associées au statut SPR de tumeurs, permettront de mieux comprendre la régulation SPR mais aussi la biologie de certains types de tumeurs. Ce type d'analyses combinées de données génomiques et protéomiques commence de plus en plus à voir le jour, notamment dans le cadre de la lutte contre le cancer du sein (Hennessy et al., 2009; Perou and Borresen-Dale, 2011; Wang et al., 2013a; Wang et al., 2013b). Une meilleure connaissance des réseaux moléculaires de signalisation, impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN en fonction du type de tumeurs, s'avère nécessaire aujourd'hui pour gagner la lutte contre le cancer. Ces analyses pourront finalement qu'apporter des bénéfices cliniques et thérapeutiques aux patients. Ces technologies de criblages ouvrent la porte pour l'apparition de thérapies personnalisées et plus efficace contre la maladie (Wang et al., 2007; Wang et al., 2010), (**Figure II.10C**).

Enfin, l'utilisation d'organismes inférieurs et moins complexes, tels que la levure (*S. cerevisiae*), la drosophile (*D. melanogaster*) ou même le ver (*C. elegans*), permettront sûrement de caractériser plus facilement la voie ATR/Pol  $\eta$  dans le contrôle SPR. En effet, dans un premier temps, il sera important d'établir le degré de conservation du mécanisme SPR ATR/Pol  $\eta$ -dépendant dans ces organismes, dans le but de pouvoir identifier par la suite les acteurs intervenant de ce mécanisme SPR par *knock-out* ou *knock-down* conditionnels, dans une lignée cellulaire particulière de gène candidats (afin s'assurer une meilleure survie de ces organismes multicellulaires), Le mécanisme NER étant conservé au cours de l'évolution, le degré de conservation de ce mécanisme pourra être montré en établissant, par exemple, le statut SPR post-UV de cellules de ces organismes en présence et en absence de l'expression des gènes homologues d'ATR/Pol  $\eta$  comme les genes Mec1/Rad30 (*S. cerevisiae*), ATL-1/PolH-1 (*C. elegans*) et mei-41/DNApol-eta (*D. melanogaster*).

Globalement, l'ensemble des investigations, brièvement proposées ici, devrait démontrer l'importance et l'impact de la voie ATR/Pol  $\eta$  et du mécanisme SPR dans la biologie cellulaire et en particulier celle du cancer, et en fin de compte, indiquer si le statut SPR et l'expression/modification des acteurs de la voie ATR/Pol  $\eta$  peuvent être de bons marqueurs pronostiques de la survie mais aussi du traitement le plus approprié pour les patients affectés de certains cancers comme le mélanome.



**Figure II.10:** Approches pour évaluer l'impact et caractériser le(s) mécanisme(s) de contrôle SPR ATR/Pol η dépendant(s), (voir texte).

**A.** Rôles possibles des MAPK ERK1/2 et JNK1/2 sur la régulation SPR. Les flèches en pointillés indiquent les liens à identifier suite à une exposition UV. **B.** Candidats proposés (vert) comme acteurs dans la réparation SPR ATR/Pol η dépendante. **C.** Approches biologiques ou intégrative des systèmes pour évaluer l'impact et caractériser le mécanisme de contrôle de la réparation SPR dans la biologie du cancer.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbatt, J.P. 2003. Interactions of atmospheric trace gases with ice surfaces: adsorption and reaction. *Chem Rev.* 103:4783-800.
- Aboussekhra, A., M. Biggerstaff, M.K. Shivji, J.A. Vilpo, V. Moncollin, V.N. Podust, M. Protic, U. Hubscher, J.M. Egly, and R.D. Wood. 1995. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell.* 80:859-68.
- Abraham, R.T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15:2177-96.
- Acharya, N., J.H. Yoon, H. Gali, I. Unk, L. Haracska, R.E. Johnson, J. Hurwitz, L. Prakash, and S. Prakash. 2008. Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase eta in translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:17724-9.
- Acharya, N., J.H. Yoon, J. Hurwitz, L. Prakash, and S. Prakash. 2010. DNA polymerase eta lacking the ubiquitin-binding domain promotes replicative lesion bypass in humans cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:10401-5.
- Adachi, M., M. Fukuda, and E. Nishida. 1999. Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *Embo J.* 18:5347-58.
- Adimoolam, S., and J.M. Ford. 2003. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2:947-54.
- Adimoolam, S., C.X. Lin, and J.M. Ford. 2001. The p53-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 (cip1, waf1, sdi1), is not required for global genomic and transcription-coupled nucleotide excision repair of UV-induced DNA photoproducts. *J Biol Chem.* 276:25813-22.
- Adler, V., S.Y. Fuchs, J. Kim, A. Kraft, M.P. King, J. Pelling, and Z. Ronai. 1995. jun-NH2-terminal kinase activation mediated by UV-induced DNA lesions in melanoma and fibroblast cells. *Cell Growth Differ.* 6:1437-46.

- Ahmed, F.E., and R.B. Setlow. 1979. Saturation of DNA repair in mammalian cells. *Photochem Photobiol.* 29:983-9.
- Akagi, J., C. Masutani, Y. Kataoka, T. Kan, E. Ohashi, T. Mori, H. Ohmori, and F. Hanaoka. 2009. Interaction with DNA polymerase eta is required for nuclear accumulation of REV1 and suppression of spontaneous mutations in human cells. *DNA Repair (Amst)*. 8:585-99.
- Alessi, D.R., A. Cuenda, P. Cohen, D.T. Dudley, and A.R. Saltiel. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 270:27489-94.
- Alt, A., K. Lammens, C. Chiocchini, A. Lammens, J.C. Pieck, D. Kuch, K.P. Hopfner, and T. Carell. 2007. Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase eta. *Science.* 318:967-70.
- Al-Tassan, N., N.H. Chmiel, J. Maynard, N. Fleming, A.L. Livingston, G.T. Williams, A.K. Hodges, D.R. Davies, S.S. David, J.R. Sampson, and J.P. Cheadle. 2002. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet.* 30:227-32.
- Anand, P., R. Shenoy, J.E. Palmer, A.J. Baines, R.Y. Lai, J. Robertson, N. Bird, T. Ostenfeld, and B.A. Chizh. 2011. Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor diltapimod in neuropathic pain following nerve injury. *Eur J Pain.* 15:1040-8.
- Andersen, P.L., F. Xu, and W. Xiao. 2008. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res.* 18:162-73.
- Andrews, A.D., S.F. Barrett, F.W. Yoder, and J.H. Robbins. 1978. Cockayne's syndrome fibroblasts have increased sensitivity to ultraviolet light but normal rates of unscheduled DNA synthesis. *J Invest Dermatol.* 70:237-9.
- Andrieux, L.O., A. Fautrel, A. Bessard, A. Guillouzo, G. Baffet, and S. Langouet. 2007. GATA-1 is essential in EGF-mediated induction of nucleotide excision repair activity and ERCC1 expression through ERK2 in human hepatoma cells. *Cancer Res.* 67:2114-23.
- Anindya, R., P.O. Mari, U. Kristensen, H. Kool, G. Giglia-Mari, L.H. Mullenders, M. Fousteri, W. Vermeulen, J.M. Egly, and J.Q. Svejstrup. 2010. A ubiquitin-binding

- domain in Cockayne syndrome B required for transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 38:637-48.
- Araujo, S.J., E.A. Nigg, and R.D. Wood. 2001. Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome. *Mol Cell Biol*. 21:2281-91.
- Arlett, C.F., S.A. Harcourt, and B.C. Broughton. 1975. The influence of caffeine on cell survival in excision-proficient and excision-deficient xeroderma pigmentosum and normal human cell strains following ultraviolet-light irradiation. *Mutat Res*. 33:341-6.
- Arnheim, N., and P. Calabrese. 2009. Understanding what determines the frequency and pattern of human germline mutations. *Nat Rev Genet*. 10:478-88.
- Aroun, A., J.L. Zhong, R.M. Tyrrell, and C. Pourzand. 2012. Iron, oxidative stress and the example of solar ultraviolet A radiation. *Photochem Photobiol Sci*. 11:118-34.
- Auclair, Y., R. Rouget, B. Affar el, and E.A. Drobetsky. 2008. ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:17896-901.
- Auclair, Y., R. Rouget, and E.A. Drobetsky. 2009. ATR kinase as master regulator of nucleotide excision repair during S phase of the cell cycle. *Cell Cycle*. 8:1865-71.
- Avkin, S., and Z. Livneh. 2002. Efficiency, specificity and DNA polymerase-dependence of translesion replication across the oxidative DNA lesion 8-oxoguanine in human cells. *Mutat Res*. 510:81-90.
- Bain, J., L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C.J. Hastie, H. McLauchlan, I. Klevernic, J.S. Arthur, D.R. Alessi, and P. Cohen. 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J*. 408:297-315.
- Bakalkin, G., G. Selivanova, T. Yakovleva, E. Kiseleva, E. Kashuba, K.P. Magnusson, L. Szekely, G. Klein, L. Terenius, and K.G. Wiman. 1995. p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res*. 23:362-9.
- Baker, S.J., S. Markowitz, E.R. Fearon, J.K. Willson, and B. Vogelstein. 1990. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*. 249:912-5.
- Bakkenist, C.J., and M.B. Kastan. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 421:499-506.

- Bandyopadhyay, S., C.Y. Chiang, J. Srivastava, M. Gersten, S. White, R. Bell, C. Kurschner, C. Martin, M. Smoot, S. Sahasrabudhe, D.L. Barber, S.K. Chanda, and T. Ideker. 2010. A human MAP kinase interactome. *Nat Methods*. 7:801-5.
- Banin, S., L. Moyal, S. Shieh, Y. Taya, C.W. Anderson, L. Chessa, N.I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh, and Y. Ziv. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 281:1674-7.
- Barkley, L.R., K. Palle, M. Durando, T.A. Day, A. Gurkar, N. Kakusho, J. Li, H. Masai, and C. Vaziri. 2012. c-Jun N-terminal kinase-mediated Rad18 phosphorylation facilitates Poleta recruitment to stalled replication forks. *Mol Biol Cell*. 23:1943-54.
- Bartek, J., and J. Lukas. 2001. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett*. 490:117-22.
- Benchimol, S. 2001. p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ*. 8:1049-51.
- Bender, K., M. Gottlicher, S. Whiteside, H.J. Rahmsdorf, and P. Herrlich. 1998. Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. *Embo J*. 17:5170-81.
- Bennett, B.L., D.T. Sasaki, B.W. Murray, E.C. O'Leary, S.T. Sakata, W. Xu, J.C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S.S. Bhagwat, A.M. Manning, and D.W. Anderson. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:13681-6.
- Berg, R.J., S.C. de Bueger, K. Guikers, H. van Weelden, W.A. van Vloten, J.C. van der Leun, and F.R. de Gruijl. 1995. Induction and disappearance of thymine dimers in human skin exposed to UVB radiation: flow cytometric measurements in replicating and nonreplicating epidermal cells. *Photochem Photobiol*. 62:970-5.
- Berg, R.J., F.R. de Gruijl, L. Roza, and J.C. van der Leun. 1993. Flow cytometric immunofluorescence assay for quantification of cyclobutylthymine dimers in separate phases of the cell cycle. *Carcinogenesis*. 14:103-6.
- Besaratinia, A., and G.P. Pfeifer. 2012. Measuring the formation and repair of UV damage at the DNA sequence level by ligation-mediated PCR. *Methods Mol Biol*. 920:189-202.
- Besaratinia, A., T.W. Synold, H.H. Chen, C. Chang, B. Xi, A.D. Riggs, and G.P. Pfeifer. 2005. DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: comparative

- analyses in the overall genome and in the p53 tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:10058-63.
- Beukers, R., and W. Berends. 1960. Isolation and identification of the irradiation product of thymine. *Biochim Biophys Acta*. 41:550-1.
- Bhagwat, N., A.L. Olsen, A.T. Wang, K. Hanada, P. Stuckert, R. Kanaar, A. D'Andrea, L.J. Niedernhofer, and P.J. McHugh. 2009. XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of cross-link repair. *Mol Cell Biol*. 29:6427-37.
- Bienko, M., C.M. Green, N. Crosetto, F. Rudolf, G. Zapart, B. Coull, P. Kannouche, G. Wider, M. Peter, A.R. Lehmann, K. Hofmann, and I. Dikic. 2005. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science*. 310:1821-4.
- Biondi, R.M., and A.R. Nebreda. 2003. Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J*. 372:1-13.
- Blandino, G., and M. Dobbstein. 2004. p73 and p63: why do we still need them? *Cell Cycle*. 3:886-94.
- Bode, A.M., and Z. Dong. 2003. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci STKE*. 2003:RE2.
- Bohr, V.A., C.A. Smith, D.S. Okumoto, and P.C. Hanawalt. 1985. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*. 40:359-69.
- Bomgarden, R.D., P.J. Lupardus, D.V. Soni, M.C. Yee, J.M. Ford, and K.A. Cimprich. 2006. Opposing effects of the UV lesion repair protein XPA and UV bypass polymerase eta on ATR checkpoint signaling. *Embo J*. 25:2605-14.
- Bomser, J.A. 2002. Selective induction of mitogen-activated protein kinases in human lens epithelial cells by ultraviolet radiation. *J Biochem Mol Toxicol*. 16:33-40.
- Bootsma, D., and R.M. Humphrey. 1968. The progression of mammalian cells through the division cycle following ultraviolet irradiation. *Mutat Res*. 5:289-98.
- Botta, E., T. Nardo, A.R. Lehmann, J.M. Egly, A.M. Pedrini, and M. Stefanini. 2002. Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy. *Hum Mol Genet*. 11:2919-28.
- Boulton, T.G., S.H. Nye, D.J. Robbins, N.Y. Ip, E. Radziejewska, S.D. Morgenbesser, R.A. DePinho, N. Panayotatos, M.H. Cobb, and G.D. Yancopoulos. 1991. ERKs: a family

- of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 65:663-75.
- Boyce, R.P., and P. Howard-Flanders. 1964. Release of Ultraviolet Light-Induced Thymine Dimers from DNA in *E. Coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 51:293-300.
- Branzei, D. 2011. Ubiquitin family modifications and template switching. *FEBS Lett*. 585:2810-7.
- Branzei, D., and M. Foiani. 2007. Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)*. 6:994-1003.
- Branzei, D., and M. Foiani. 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:297-308.
- Brash, D.E. 1988. UV mutagenic photoproducts in *Escherichia coli* and human cells: a molecular genetics perspective on human skin cancer. *Photochem Photobiol*. 48:59-66.
- Broughton, B.C., A. Cordonnier, W.J. Kleijer, N.G. Jaspers, H. Fawcett, A. Raams, V.H. Garritsen, A. Sary, M.F. Avril, F. Boudsocq, C. Masutani, F. Hanaoka, R.P. Fuchs, A. Sarasin, and A.R. Lehmann. 2002. Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:815-20.
- Brown, E.J., and D. Baltimore. 2000. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev*. 14:397-402.
- Brown, J.P., W. Wei, and J.M. Sedivy. 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*. 277:831-4.
- Brown, L., and S. Benchimol. 2006. The involvement of MAPK signaling pathways in determining the cellular response to p53 activation: cell cycle arrest or apoptosis. *J Biol Chem*. 281:3832-40.
- Brunet, A., D. Roux, P. Lenormand, S. Dowd, S. Keyse, and J. Pouyssegur. 1999. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo J*. 18:664-74.
- Bulavin, D.V., Y. Higashimoto, I.J. Popoff, W.A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella, and A.J. Fornace, Jr. 2001. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature*. 411:102-7.

- Bulavin, D.V., S. Saito, M.C. Hollander, K. Sakaguchi, C.W. Anderson, E. Appella, and A.J. Fornace, Jr. 1999. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *Embo J.* 18:6845-54.
- Bunz, F., A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J.P. Brown, J.M. Sedivy, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 282:1497-501.
- Burrows, A.E., and S.J. Elledge. 2008. How ATR turns on: TopBP1 goes on ATRIP with ATR. *Genes Dev.* 22:1416-21.
- Buschmann, T., O. Potapova, A. Bar-Shira, V.N. Ivanov, S.Y. Fuchs, S. Henderson, V.A. Fried, T. Minamoto, D. Alarcon-Vargas, M.R. Pincus, W.A. Gaarde, N.J. Holbrook, Y. Shiloh, and Z. Ronai. 2001. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol.* 21:2743-54.
- Cadet, J., T. Douki, D. Gasparutto, and J.L. Ravanat. 2003. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res.* 531:5-23.
- Cadet, J., T. Douki, J.P. Pouget, J.L. Ravanat, and S. Sauvaigo. 2001. Effects of UV and visible radiations on cellular DNA. *Curr Probl Dermatol.* 29:62-73.
- Cadet, J., T. Douki, and J.L. Ravanat. 2010. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic Biol Med.* 49:9-21.
- Cadet, J., N.E. Gentner, B. Rozga, and M.C. Paterson. 1983. Rapid quantitation of ultraviolet-induced thymine-containing dimers in human cell DNA by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 280:99-108.
- Cadet, J., S. Mouret, J.L. Ravanat, and T. Douki. 2012. Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions. *Photochem Photobiol.* 88:1048-65.
- Cadet, J., E. Sage, and T. Douki. 2005. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res.* 571:3-17.
- Caldecott, K.W. 2001. Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays.* 23:447-55.
- Caldecott, K.W. 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet.* 9:619-31.

- Cargnello, M., and P.P. Roux. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75:50-83.
- Caron, R.W., A. Yacoub, C. Mitchell, X. Zhu, Y. Hong, T. Sasazuki, S. Shirasawa, M.P. Hagan, S. Grant, and P. Dent. 2005. Radiation-stimulated ERK1/2 and JNK1/2 signaling can promote cell cycle progression in human colon cancer cells. *Cell Cycle.* 4:456-64.
- Casar, B., A. Pinto, and P. Crespo. 2008. Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Mol Cell.* 31:708-21.
- Ceppi, P., S. Novello, A. Cambieri, M. Longo, V. Monica, M. Lo Iacono, M. Giaj-Levra, S. Saviozzi, M. Volante, M. Papotti, and G. Scagliotti. 2009. Polymerase eta mRNA expression predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 15:1039-45.
- Chan, K., J.F. Sterling, S.A. Roberts, A.S. Bhagwat, M.A. Resnick, and D.A. Gordenin. 2012. Base damage within single-strand DNA underlies in vivo hypermutability induced by a ubiquitous environmental agent. *PLoS Genet.* 8:e1003149.
- Chang, I.Y., M.H. Kim, H.B. Kim, D.Y. Lee, S.H. Kim, H.Y. Kim, and H.J. You. 2005. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 327:225-33.
- Chapnick, D.A., L. Warner, J. Bernet, T. Rao, and X. Liu. 2011. Partners in crime: the TGFbeta and MAPK pathways in cancer progression. *Cell Biosci.* 1:42.
- Chappell, W.H., L.S. Steelman, J.M. Long, R.C. Kempf, S.L. Abrams, R.A. Franklin, J. Basecke, F. Stivala, M. Donia, P. Fagone, G. Malaponte, M.C. Mazzarino, F. Nicoletti, M. Libra, D. Maksimovic-Ivanic, S. Mijatovic, G. Montalto, M. Cervello, P. Laidler, M. Milella, A. Tafuri, A. Bonati, C. Evangelisti, L. Cocco, A.M. Martelli, and J.A. McCubrey. 2011. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget.* 2:135-64.
- Chen, J., M.K. Ghorai, G. Kenney, and J. Stubbe. 2008. Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res.* 36:3781-90.

- Chen, L.F., and W.C. Greene. 2004. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:392-401.
- Chen, P., J.F. O'Neal, N.D. Ebelt, M.A. Cantrell, S. Mitra, A. Nasrazadani, T.L. Vandenbroek, L.E. Heasley, and C.L. Van Den Berg. 2010. Jnk2 effects on tumor development, genetic instability and replicative stress in an oncogene-driven mouse mammary tumor model. *PLoS One.* 5:e10443.
- Chen, Y.R., X. Wang, D. Templeton, R.J. Davis, and T.H. Tan. 1996. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem.* 271:31929-36.
- Chen, Z., T.B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M.H. Cobb. 2001. MAP kinases. *Chem Rev.* 101:2449-76.
- Choi, J.H., L.A. Lindsey-Boltz, M. Kemp, A.C. Mason, M.S. Wold, and A. Sancar. 2010. Reconstitution of RPA-covered single-stranded DNA-activated ATR-Chk1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:13660-5.
- Christians, F.C., and P.C. Hanawalt. 1993. Lack of transcription-coupled repair in mammalian ribosomal RNA genes. *Biochemistry.* 32:10512-8.
- Christmann, M., M.T. Tomicic, D. Aasland, and B. Kaina. 2007. A role for UV-light-induced c-Fos: Stimulation of nucleotide excision repair and protection against sustained JNK activation and apoptosis. *Carcinogenesis.* 28:183-90.
- Christmann, M., M.T. Tomicic, J. Origer, D. Aasland, and B. Kaina. 2006. c-Fos is required for excision repair of UV-light induced DNA lesions by triggering the re-synthesis of XPF. *Nucleic Acids Res.* 34:6530-9.
- Cimprich, K.A., and D. Cortez. 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:616-27.
- Cleaver, J.E. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature.* 218:652-6.
- Cleaver, J.E. 1972. Xeroderma pigmentosum: variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light. *J Invest Dermatol.* 58:124-8.
- Cleaver, J.E. 2000. Common pathways for ultraviolet skin carcinogenesis in the repair and replication defective groups of xeroderma pigmentosum. *J Dermatol Sci.* 23:1-11.

- Cleaver, J.E. 2005. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer*. 5:564-73.
- Cleaver, J.E. 2012. Photosensitivity syndrome brings to light a new transcription-coupled DNA repair cofactor. *Nat Genet*. 44:477-8.
- Cleaver, J.E., R.M. Arutyunyan, T. Sarkisian, W.K. Kaufmann, A.E. Greene, and L. Coriell. 1980. Similar defects in DNA repair and replication in the pigmented xerodermoid and the xeroderma pigmentosum variants. *Carcinogenesis*. 1:647-55.
- Cleaver, J.E., E.T. Lam, and I. Revet. 2009. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet*. 10:756-68.
- Cleaver, J.E., and I. Revet. 2008. Clinical implications of the basic defects in Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum and the DNA lesions responsible for cancer, neurodegeneration and aging. *Mech Ageing Dev*. 129:492-7.
- Cobb, M.H., and E.J. Goldsmith. 2000. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci*. 25:7-9.
- Coin, F., V. Oksenyshyn, and J.M. Egly. 2007. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 26:245-56.
- Collins, C., X. Zhou, R. Wang, M.C. Barth, T. Jiang, J.A. Coderre, and P.C. Dedon. 2005. Differential oxidation of deoxyribose in DNA by gamma and alpha-particle radiation. *Radiat Res*. 163:654-62.
- Compe, E., and J.M. Egly. 2012. TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13:343-54.
- Cooke, M.S., I.D. Podmore, N. Mistry, M.D. Evans, K.E. Herbert, H.R. Griffiths, and J. Lunec. 2003. Immunochemical detection of UV-induced DNA damage and repair. *J Immunol Methods*. 280:125-33.
- Cortez, D., G. Glick, and S.J. Elledge. 2004. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:10078-83.
- Costanzo, V., K. Robertson, M. Bibikova, E. Kim, D. Grieco, M. Gottesman, D. Carroll, and J. Gautier. 2001. Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication. *Mol Cell*. 8:137-47.

- Costanzo, V., D. Shechter, P.J. Lupardus, K.A. Cimprich, M. Gottesman, and J. Gautier. 2003. An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Mol Cell*. 11:203-13.
- Couedel, C., K.D. Mills, M. Barchi, L. Shen, A. Olshen, R.D. Johnson, A. Nussenzweig, J. Essers, R. Kanaar, G.C. Li, F.W. Alt, and M. Jasin. 2004. Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells. *Genes Dev*. 18:1293-304.
- Crouse, G.F. 2012. Mismatch repair outside of replication. *Cell Cycle*. 11:2773-4.
- Cuevas, B.D., A.N. Abell, and G.L. Johnson. 2007. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene*. 26:3159-71.
- Dammann, R., and G.P. Pfeifer. 1997. Lack of gene- and strand-specific DNA repair in RNA polymerase III-transcribed human tRNA genes. *Mol Cell Biol*. 17:219-29.
- Davies, S.P., H. Reddy, M. Caivano, and P. Cohen. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 351:95-105.
- Davis, R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 103:239-52.
- Day, T.A., K. Palle, L.R. Barkley, N. Kakusho, Y. Zou, S. Tateishi, A. Verreault, H. Masai, and C. Vaziri. 2010. Phosphorylated Rad18 directs DNA polymerase eta to sites of stalled replication. *J Cell Biol*. 191:953-66.
- de Boer, J., and J.H. Hoeijmakers. 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 21:453-60.
- de Gruijl, F.R. 2000. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Methods Enzymol*. 319:359-66.
- de Gruijl, F.R., and J.C. van der Leun. 2000. Environment and health: 3. Ozone depletion and ultraviolet radiation. *Cmaj*. 163:851-5.
- Deans, A.J., and S.C. West. 2011. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*. 11:467-80.
- Dedon, P.C. 2008. The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. *Chem Res Toxicol*. 21:206-19.
- Derheimer, F.A., H.M. O'Hagan, H.M. Krueger, S. Hanasoge, M.T. Paulsen, and M. Ljungman. 2007. RPA and ATR link transcriptional stress to p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:12778-83.

- Derijard, B., M. Hibi, I.H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, and R.J. Davis. 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 76:1025-37.
- Despras, E., F. Daboussi, O. Hyrien, K. Marheineke, and P.L. Kannouche. 2010. ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells. *Hum Mol Genet*. 19:1690-701.
- Devary, Y., R.A. Gottlieb, T. Smeal, and M. Karin. 1992. The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell*. 71:1081-91.
- Devary, Y., C. Rosette, J.A. DiDonato, and M. Karin. 1993. NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science*. 261:1442-5.
- Dhanasekaran, D.N., K. Kashef, C.M. Lee, H. Xu, and E.P. Reddy. 2007. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene*. 26:3185-202.
- Dhawan, A., M. Bajpayee, and D. Parmar. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*. 25:5-32.
- Dianov, G.L., K.M. Sleeth, Dianova, II, and S.L. Allinson. 2003. Repair of abasic sites in DNA. *Mutat Res*. 531:157-63.
- Dickens, M., J.S. Rogers, J. Cavanagh, A. Raitano, Z. Xia, J.R. Halpern, M.E. Greenberg, C.L. Sawyers, and R.J. Davis. 1997. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science*. 277:693-6.
- Dinant, C., M.S. Luijsterburg, T. Hofer, G. von Bornstaedt, W. Vermeulen, A.B. Houtsmuller, and R. van Driel. 2009. Assembly of multiprotein complexes that control genome function. *J Cell Biol*. 185:21-6.
- Diskin, R., M. Lebendiker, D. Engelberg, and O. Livnah. 2007. Structures of p38alpha active mutants reveal conformational changes in L16 loop that induce autophosphorylation and activation. *J Mol Biol*. 365:66-76.
- Dizdaroglu, M. 1991. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med*. 10:225-42.
- Dizdaroglu, M. 2012. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett*. 327:26-47.
- Donzelli, M., and G.F. Draetta. 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep*. 4:671-7.

- Douki, T., and J. Cadet. 2001. Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions. *Biochemistry*. 40:2495-501.
- Douki, T., M. Court, and J. Cadet. 2000a. Electrospray-mass spectrometry characterization and measurement of far-UV-induced thymine photoproducts. *J Photochem Photobiol B*. 54:145-54.
- Douki, T., M. Court, S. Sauvaigo, F. Odin, and J. Cadet. 2000b. Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Biol Chem*. 275:11678-85.
- Douki, T., D. Perdiz, P. Grof, Z. Kuluncsics, E. Moustacchi, J. Cadet, and E. Sage. 1999. Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role. *Photochem Photobiol*. 70:184-90.
- Douki, T., A. Reynaud-Angelin, J. Cadet, and E. Sage. 2003. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry*. 42:9221-6.
- Drobetsky, E.A., J. Turcotte, and A. Chateauneuf. 1995. A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:2350-4.
- Du, L., C.S. Lyle, T.B. Obey, W.A. Gaarde, J.A. Muir, B.L. Bennett, and T.C. Chambers. 2004. Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity: evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. *J Biol Chem*. 279:11957-66.
- Dumstorf, C.A., A.B. Clark, Q. Lin, G.E. Kissling, T. Yuan, R. Kucherlapati, W.G. McGregor, and T.A. Kunkel. 2006. Participation of mouse DNA polymerase iota in strand-biased mutagenic bypass of UV photoproducts and suppression of skin cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:18083-8.
- Dunkern, T.R., and B. Kaina. 2002. Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide excision repair-deficient Chinese hamster cells. *Mol Biol Cell*. 13:348-61.

- Durbeej, B., and L.A. Eriksson. 2003. On the formation of cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA: why are thymines more reactive? *Photochem Photobiol.* 78:159-67.
- Egly, J.M., and F. Coin. 2011. A history of TFIIH: two decades of molecular biology on a pivotal transcription/repair factor. *DNA Repair (Amst).* 10:714-21.
- El-Abaseri, T.B., J. Fuhrman, C. Trempus, I. Shendrik, R.W. Tennant, and L.A. Hansen. 2005. Chemoprevention of UV light-induced skin tumorigenesis by inhibition of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 65:3958-65.
- el-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 75:817-25.
- Elenitoba-Johnson, K.S., S.D. Jenson, R.T. Abbott, R.A. Palais, S.D. Bohling, Z. Lin, S. Tripp, P.J. Shami, L.Y. Wang, R.W. Coupland, R. Buckstein, B. Perez-Ordenez, S.L. Perkins, I.D. Dube, and M.S. Lim. 2003. Involvement of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen-activated protein kinase as a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:7259-64.
- Elion, E.A. 2001. The Ste5p scaffold. *J Cell Sci.* 114:3967-78.
- El-Mahdy, M.A., Q. Zhu, Q.E. Wang, G. Wani, M. Praetorius-Ibba, and A.A. Wani. 2006. Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC. *J Biol Chem.* 281:13404-11.
- Engel, F.B., M. Schebesta, M.T. Duong, G. Lu, S. Ren, J.B. Madwed, H. Jiang, Y. Wang, and M.T. Keating. 2005. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* 19:1175-87.
- English, J.M., and M.H. Cobb. 2002. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 23:40-5.
- Engstrom, W., A. Ward, and K. Moorwood. 2010. The role of scaffold proteins in JNK signalling. *Cell Prolif.* 43:56-66.
- Escribano-Diaz, C., A. Orthwein, A. Fradet-Turcotte, M. Xing, J.T. Young, J. Tkac, M.A. Cook, A.P. Rosebrock, M. Munro, M.D. Canny, D. Xu, and D. Durocher. 2013. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell.* 49:872-83.

- Essers, J., W. Vermeulen, and A.B. Houtsmuller. 2006. DNA damage repair: anytime, anywhere? *Curr Opin Cell Biol.* 18:240-6.
- Evans, E., J. Fellows, A. Coffey, and R.D. Wood. 1997. Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *Embo J.* 16:625-38.
- Eyers, P.A., M. Craxton, N. Morrice, P. Cohen, and M. Goedert. 1998. Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem Biol.* 5:321-8.
- Fagbemi, A.F., B. Orelli, and O.D. Scharer. 2011. Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 10:722-9.
- Faghri, S., D. Tamura, K.H. Kraemer, and J.J. Digiovanna. 2008. Trichothiodystrophy: a systematic review of 112 published cases characterises a wide spectrum of clinical manifestations. *J Med Genet.* 45:609-21.
- Favata, M.F., K.Y. Horiuchi, E.J. Manos, A.J. Daulerio, D.A. Stradley, W.S. Feeser, D.E. Van Dyk, W.J. Pitts, R.A. Earl, F. Hobbs, R.A. Copeland, R.L. Magolda, P.A. Scherle, and J.M. Trzaskos. 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.* 273:18623-32.
- Fearon, E.R., and B. Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61:759-67.
- Fei, J., N. Kaczmarek, A. Luch, A. Glas, T. Carell, and H. Naegeli. 2011. Regulation of nucleotide excision repair by UV-DDB: prioritization of damage recognition to internucleosomal DNA. *PLoS Biol.* 9:e1001183.
- Feng, Z., W. Hu, L.A. Chasin, and M.S. Tang. 2003. Effects of genomic context and chromatin structure on transcription-coupled and global genomic repair in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 31:5897-906.
- Ferguson, B.E., and D.H. Oh. 2005. Proficient global nucleotide excision repair in human keratinocytes but not in fibroblasts deficient in p53. *Cancer Res.* 65:8723-9.
- Finlay, C.A., P.W. Hinds, and A.J. Levine. 1989. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell.* 57:1083-93.
- Fleming, Y., C.G. Armstrong, N. Morrice, A. Paterson, M. Goedert, and P. Cohen. 2000. Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase

- (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J.* 352 Pt 1:145-54.
- Flynn, R.L., and L. Zou. 2011. ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends Biochem Sci.* 36:133-40.
- Ford, J.M., E.L. Baron, and P.C. Hanawalt. 1998. Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Res.* 58:599-603.
- Ford, J.M., and P.C. Hanawalt. 1995. Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8876-80.
- Ford, J.M., and P.C. Hanawalt. 1997. Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J Biol Chem.* 272:28073-80.
- Fousteri, M., and L.H. Mullenders. 2008. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 18:73-84.
- Francis, M.A., and A.J. Rainbow. 1999. UV-enhanced reactivation of a UV-damaged reporter gene suggests transcription-coupled repair is UV-inducible in human cells. *Carcinogenesis.* 20:19-26.
- Friedberg, E.C. 1996. Relationships between DNA repair and transcription. *Annu Rev Biochem.* 65:15-42.
- Friedel, A.M., B.L. Pike, and S.M. Gasser. 2009. ATR/Mec1: coordinating fork stability and repair. *Curr Opin Cell Biol.* 21:237-44.
- Fritsche, E., C. Schafer, C. Calles, T. Bernsmann, T. Bernshausen, M. Wurm, U. Hubenthal, J.E. Cline, H. Hajimiragha, P. Schroeder, L.O. Klotz, A. Rannug, P. Furst, H. Hanenberg, J. Abel, and J. Krutmann. 2007. Lightning up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:8851-6.
- Fuchs, S.Y., V. Adler, T. Buschmann, Z. Yin, X. Wu, S.N. Jones, and Z. Ronai. 1998. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev.* 12:2658-63.

- Fuss, J.O., and J.A. Tainer. 2011. XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase. *DNA Repair (Amst)*. 10:697-713.
- Gaestel, M. 2006. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:120-30.
- Gaestel, M., A. Kotlyarov, and M. Kracht. 2009. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov*. 8:480-99.
- Galloway, A.M., M. Liuzzi, and M.C. Paterson. 1994. Metabolic processing of cyclobutyl pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts in UV-treated human cells. Evidence for distinct excision-repair pathways. *J Biol Chem*. 269:974-80.
- Garinis, G.A., J.R. Mitchell, M.J. Moorhouse, K. Hanada, H. de Waard, D. Vandeputte, J. Jans, K. Brand, M. Smid, P.J. van der Spek, J.H. Hoeijmakers, R. Kanaar, and G.T. van der Horst. 2005. Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *Embo J*. 24:3952-62.
- Gates, K.S. 2009. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chem Res Toxicol*. 22:1747-60.
- Gedik, C.M., S.W. Ewen, and A.R. Collins. 1992. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol*. 62:313-20.
- Gilljam, K.M., E. Feyzi, P.A. Aas, M.M. Sousa, R. Muller, C.B. Vagbo, T.C. Catterall, N.B. Liabakk, G. Slupphaug, F. Drablos, H.E. Krokan, and M. Otterlei. 2009. Identification of a novel, widespread, and functionally important PCNA-binding motif. *J Cell Biol*. 186:645-54.
- Gilljam, K.M., R. Muller, N.B. Liabakk, and M. Otterlei. 2012. Nucleotide excision repair is associated with the replisome and its efficiency depends on a direct interaction between XPA and PCNA. *PLoS One*. 7:e49199.
- Gjerset, R.A., S. Lebedeva, A. Haghighi, S.T. Turla, and D. Mercola. 1999. Inhibition of the Jun kinase pathway blocks DNA repair, enhances p53-mediated apoptosis and promotes gene amplification. *Cell Growth Differ*. 10:545-54.

- Gohler, T., S. Sabbioneda, C.M. Green, and A.R. Lehmann. 2011. ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase eta is needed for efficient recovery from UV damage. *J Cell Biol.* 192:219-27.
- Goldstein, D.M., A. Kuglstatter, Y. Lou, and M.J. Soth. 2010. Selective p38alpha inhibitors clinically evaluated for the treatment of chronic inflammatory disorders. *J Med Chem.* 53:2345-53.
- Gong, X., A. Liu, X. Ming, P. Deng, and Y. Jiang. 2010. UV-induced interaction between p38 MAPK and p53 serves as a molecular switch in determining cell fate. *FEBS Lett.* 584:4711-6.
- Gonzales, M., and G.T. Bowden. 2002. The role of PI 3-kinase in the UVB-induced expression of c-fos. *Oncogene.* 21:2721-8.
- Graf, N., W.H. Ang, G. Zhu, M. Myint, and S.J. Lippard. 2011. Role of endonucleases XPF and XPG in nucleotide excision repair of platinated DNA and cisplatin/oxaliplatin cytotoxicity. *Chembiochem.* 12:1115-23.
- Gregg, S.Q., A.R. Robinson, and L.J. Niedernhofer. 2011. Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease. *DNA Repair (Amst).* 10:781-91.
- Groisman, R., I. Kuraoka, O. Chevallier, N. Gaye, T. Magnaldo, K. Tanaka, A.F. Kisselev, A. Harel-Bellan, and Y. Nakatani. 2006. CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes Dev.* 20:1429-34.
- Groisman, R., J. Polanowska, I. Kuraoka, J. Sawada, M. Saijo, R. Drapkin, A.F. Kisselev, K. Tanaka, and Y. Nakatani. 2003. The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell.* 113:357-67.
- Gross, S., A. Knebel, T. Tenev, A. Neininger, M. Gaestel, P. Herrlich, and F.D. Bohmer. 1999. Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 274:26378-86.
- Gueranger, Q., A. Stary, S. Aoufouchi, A. Faili, A. Sarasin, C.A. Reynaud, and J.C. Weill. 2008. Role of DNA polymerases eta, iota and zeta in UV resistance and UV-induced mutagenesis in a human cell line. *DNA Repair (Amst).* 7:1551-62.

- Guzder, S.N., P. Sung, L. Prakash, and S. Prakash. 1996. Nucleotide excision repair in yeast is mediated by sequential assembly of repair factors and not by a pre-assembled repairosome. *J Biol Chem.* 271:8903-10.
- Hainaut, P., T. Soussi, B. Shomer, M. Hollstein, M. Greenblatt, E. Hovig, C.C. Harris, and R. Montesano. 1997. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Res.* 25:151-7.
- Haiser, K., B.P. Fingerhut, K. Heil, A. Glas, T.T. Herzog, B.M. Pilles, W.J. Schreier, W. Zinth, R. de Vivie-Riedle, and T. Carell. 2012. Mechanism of UV-induced formation of Dewar lesions in DNA. *Angew Chem Int Ed Engl.* 51:408-11.
- Han, Z., D.L. Boyle, L. Chang, B. Bennett, M. Karin, L. Yang, A.M. Manning, and G.S. Firestein. 2001. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 108:73-81.
- Hanawalt, P.C. 2001. Revisiting the rodent repairadox. *Environ Mol Mutagen.* 38:89-96.
- Hanawalt, P.C. 2002. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene.* 21:8949-56.
- Hanawalt, P.C., and R.H. Haynes. 1965. Repair Replication of DNA in Bacteria: Irrelevance of Chemical Nature of Base Defect. *Biochem Biophys Res Commun.* 19:462-7.
- Harfe, B.D., and S. Jinks-Robertson. 2000. DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet.* 34:359-399.
- Harrington, C.F., R.C. Le Pla, G.D. Jones, A.L. Thomas, and P.B. Farmer. 2010. Determination of cisplatin 1,2-intrastrand guanine-guanine DNA adducts in human leukocytes by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 23:1313-21.
- Hartlerode, A.J., and R. Scully. 2009. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J.* 423:157-68.
- Hartwell, L.H., and T.A. Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 246:629-34.
- Hashimoto, S., and J.M. Egly. 2009. Trichothiodystrophy view from the molecular basis of DNA repair/transcription factor TFIIH. *Hum Mol Genet.* 18:R224-30.
- Hass, C.S., K. Lam, and M.S. Wold. 2012. Repair-specific functions of replication protein A. *J Biol Chem.* 287:3908-18.

- Hayakawa, J., C. Depatie, M. Ohmichi, and D. Mercola. 2003. The activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)-dependent enhanced DNA repair. *J Biol Chem.* 278:20582-92.
- Hayakawa, J., and Y. Okabayashi. 2004. Simultaneous analysis of phospholipid in rabbit bronchoalveolar lavage fluid by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 35:583-92.
- Heil, K., D. Pearson, and T. Carell. 2011. Chemical investigation of light induced DNA bipyrimidine damage and repair. *Chem Soc Rev.* 40:4271-8.
- Helt, C.E., W.A. Cliby, P.C. Keng, R.A. Bambara, and M.A. O'Reilly. 2005. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem.* 280:1186-92.
- Hendel, A., P.H. Krijger, N. Diamant, Z. Goren, P. Langerak, J. Kim, T. Reissner, K.Y. Lee, N.E. Geacintov, T. Carell, K. Myung, S. Tateishi, A. D'Andrea, H. Jacobs, and Z. Livneh. 2011. PCNA ubiquitination is important, but not essential for translesion DNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Genet.* 7:e1002262.
- Henkler, F., K. Stolpmann, and A. Luch. 2012. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses. *Exs.* 101:107-31.
- Hennessy, B.T., A.M. Gonzalez-Angulo, M.S. Carey, and G.B. Mills. 2009. A systems approach to analysis of molecular complexity in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 15:417-9.
- Herrlich, P., M. Karin, and C. Weiss. 2008. Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response. *Mol Cell.* 29:279-90.
- Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci.* 117:5965-73.
- Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7:2135-48.
- Hideg, E., M.A. Jansen, and A. Strid. 2013. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci.* 18:107-15.

- Hideshima, T., T. Hayashi, D. Chauhan, M. Akiyama, P. Richardson, and K. Anderson. 2003. Biologic sequelae of c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) activation in multiple myeloma cell lines. *Oncogene*. 22:8797-801.
- Hildesheim, J., R.T. Awwad, and A.J. Fornace, Jr. 2004. p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitor protects the epidermis against the acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses. *J Invest Dermatol*. 122:497-502.
- Hirota, K., E. Sonoda, T. Kawamoto, A. Motegi, C. Masutani, F. Hanaoka, D. Szuts, S. Iwai, J.E. Sale, A. Lehmann, and S. Takeda. 2010. Simultaneous disruption of two DNA polymerases, Poleta and Polzeta, in Avian DT40 cells unmasks the role of Poleta in cellular response to various DNA lesions. *PLoS Genet*. 6.
- Ho, E.L., and M.S. Satoh. 2003. Repair of single-strand DNA interruptions by redundant pathways and its implication in cellular sensitivity to DNA-damaging agents. *Nucleic Acids Res*. 31:7032-40.
- Hochwagen, A., and A. Amon. 2006. Checking your breaks: surveillance mechanisms of meiotic recombination. *Curr Biol*. 16:R217-28.
- Hoege, C., B. Pfander, G.L. Moldovan, G. Pyrowolakis, and S. Jentsch. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*. 419:135-41.
- Hoeijmakers, J.H. 1993a. Nucleotide excision repair I: from E. coli to yeast. *Trends Genet*. 9:173-7.
- Hoeijmakers, J.H. 1993b. Nucleotide excision repair. II: From yeast to mammals. *Trends Genet*. 9:211-7.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C.C. Harris. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science*. 253:49-53.
- Hoogstraten, D., S. Bergink, J.M. Ng, V.H. Verbiest, M.S. Luijsterburg, B. Geverts, A. Raams, C. Dinant, J.H. Hoeijmakers, W. Vermeulen, and A.B. Houtsmuller. 2008. Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC. *J Cell Sci*. 121:2850-9.
- Houldsworth, J., and M.F. Lavin. 1980. Effect of ionizing radiation on DNA synthesis in ataxia telangiectasia cells. *Nucleic Acids Res*. 8:3709-20.

- Houtsmuller, A.B., S. Rademakers, A.L. Nigg, D. Hoogstraten, J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. 1999. Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science*. 284:958-61.
- Howard-Flanders, P., E. Simson, and L. Theriot. 1964. The Excision of Thymine Dimers from DNA, Filament Formation and Sensitivity to Ultraviolet Light in *Escherichia Coli* K-12. *Mutat Res*. 106:219-26.
- Hsieh, P. 2001. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutat Res*. 486:71-87.
- Huang, C., W.Y. Ma, A. Maxiner, Y. Sun, and Z. Dong. 1999. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem*. 274:12229-35.
- Huang, R.P., J.X. Wu, Y. Fan, and E.D. Adamson. 1996. UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J Cell Biol*. 133:211-20.
- Hui, L., L. Bakiri, A. Mairhorfer, N. Schweifer, C. Haslinger, L. Kenner, V. Komnenovic, H. Scheuch, H. Beug, and E.F. Wagner. 2007a. p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nat Genet*. 39:741-9.
- Hui, L., L. Bakiri, E. Stepniak, and E.F. Wagner. 2007b. p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle*. 6:2429-33.
- Husain, I., J. Griffith, and A. Sancar. 1988. Thymine dimers bend DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:2558-62.
- Hwang, B.J., J.M. Ford, P.C. Hanawalt, and G. Chu. 1999. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:424-8.
- Hwang, B.J., S. Toering, U. Francke, and G. Chu. 1998. p48 Activates a UV-damaged-DNA binding factor and is defective in xeroderma pigmentosum group E cells that lack binding activity. *Mol Cell Biol*. 18:4391-9.
- Inui, H., K.S. Oh, C. Nadem, T. Ueda, S.G. Khan, A. Metin, E. Gozukara, S. Emmert, H. Slor, D.B. Busch, C.C. Baker, J.J. DiGiovanna, D. Tamura, C.S. Seitz, A. Gratchev, W.H. Wu, K.Y. Chung, H.J. Chung, E. Azizi, R. Woodgate, T.D. Schneider, and K.H. Kraemer. 2008. Xeroderma pigmentosum-variant patients from America, Europe, and Asia. *J Invest Dermatol*. 128:2055-68.
- Iordanov, M.S., R.J. Choi, O.P. Ryabinina, T.H. Dinh, R.K. Bright, and B.E. Magun. 2002. The UV (Ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected

- uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol.* 22:5380-94.
- Ip, S.C., U. Rass, M.G. Blanco, H.R. Flynn, J.M. Skehel, and S.C. West. 2008. Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature.* 456:357-61.
- Isaacs, R.J., and H.P. Spielmann. 2004. A model for initial DNA lesion recognition by NER and MMR based on local conformational flexibility. *DNA Repair (Amst).* 3:455-64.
- Ivanov, V.N., and Z. Ronai. 2000. p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression. *Oncogene.* 19:3003-12.
- Iyer, R.R., A. Pluciennik, V. Burdett, and P.L. Modrich. 2006. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev.* 106:302-23.
- Jackson, M.W., and S.J. Berberich. 2000. MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol Cell Biol.* 20:1001-7.
- Jackson, S.P. 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis.* 23:687-96.
- Jaspers, N.G., A. Raams, M.C. Silengo, N. Wijgers, L.J. Niedernhofer, A.R. Robinson, G. Giglia-Mari, D. Hoogstraten, W.J. Kleijer, J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. 2007. First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. *Am J Hum Genet.* 80:457-66.
- Jazayeri, A., J. Falck, C. Lukas, J. Bartek, G.C. Smith, J. Lukas, and S.P. Jackson. 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 8:37-45.
- Jeffers, J.R., E. Parganas, Y. Lee, C. Yang, J. Wang, J. Brennan, K.H. MacLean, J. Han, T. Chittenden, J.N. Ihle, P.J. McKinnon, J.L. Cleveland, and G.P. Zambetti. 2003. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell.* 4:321-8.
- Jiang, Y., M. Rabbi, M. Kim, C. Ke, W. Lee, R.L. Clark, P.A. Mieczkowski, and P.E. Marszalek. 2009. UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly. *Biophys J.* 96:1151-8.

- Johnson, J.M., and J.J. Latimer. 2005. Analysis of DNA repair using transfection-based host cell reactivation. *Methods Mol Biol.* 291:321-35.
- Johnson, R., V. Borde, M.J. Neale, A. Bishop-Bailey, M. North, S. Harris, A. Nicolas, and A.S. Goldman. 2007. Excess single-stranded DNA inhibits meiotic double-strand break repair. *PLoS Genet.* 3:e223.
- Johnson, R.E., L. Haracska, S. Prakash, and L. Prakash. 2001. Role of DNA polymerase zeta in the bypass of a (6-4) TT photoproduct. *Mol Cell Biol.* 21:3558-63.
- Johnson, R.E., C.M. Kondratyck, S. Prakash, and L. Prakash. 1999. hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science.* 285:263-5.
- Jones, K.L., L. Zhang, K.L. Seldeen, and F. Gong. 2010. Detection of bulky DNA lesions: DDB2 at the interface of chromatin and DNA repair in eukaryotes. *IUBMB Life.* 62:803-11.
- Jung, E.G. 1970. New form of molecular defect in xeroderma pigmentosum. *Nature.* 228:361-2.
- Junttila, M.R., S.P. Li, and J. Westermarck. 2008. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *Faseb J.* 22:954-65.
- Kabuyama, Y., M.K. Homma, M. Sekimata, and Y. Homma. 2001. Wavelength-specific activation of MAP kinase family proteins by monochromatic UV irradiation. *Photochem Photobiol.* 73:147-52.
- Kaghad, M., H. Bonnet, A. Yang, L. Creancier, J.C. Biscan, A. Valent, A. Minty, P. Chalon, J.M. Lelias, X. Dumont, P. Ferrara, F. McKeon, and D. Caput. 1997. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell.* 90:809-19.
- Kannouche, P., B.C. Broughton, M. Volker, F. Hanaoka, L.H. Mullenders, and A.R. Lehmann. 2001. Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev.* 15:158-72.
- Kannouche, P., A.R. Fernandez de Henestrosa, B. Coull, A.E. Vidal, C. Gray, D. Zicha, R. Woodgate, and A.R. Lehmann. 2003. Localization of DNA polymerases eta and iota to the replication machinery is tightly co-ordinated in human cells. *Embo J.* 22:1223-33.
- Kannouche, P.L., and A.R. Lehmann. 2004. Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle.* 3:1011-3.

- Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 270:16483-6.
- Karin, M. 2006. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 441:431-6.
- Kasperek, T.R., and T.C. Humphrey. 2011. DNA double-strand break repair pathways, chromosomal rearrangements and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 22:886-97.
- Kass, E.M., H.R. Helgadottir, C.C. Chen, M. Barbera, R. Wang, U.K. Westermarck, T. Ludwig, M.E. Moynahan, and M. Jasin. 2013. Double-strand break repair by homologous recombination in primary mouse somatic cells requires BRCA1 but not the ATM kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:5564-9.
- Kastan, M.B., and J. Bartek. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature.* 432:316-23.
- Kato, T., Jr., M. Delhase, A. Hoffmann, and M. Karin. 2003. CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response. *Mol Cell.* 12:829-39.
- Kaufmann, W.K., R.J. Rahija, S.A. MacKenzie, and D.G. Kaufman. 1987. Cell cycle-dependent initiation of hepatocarcinogenesis in rats by (+/-)-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Cancer Res.* 47:3771-5.
- Kelly, C.M., and J.J. Latimer. 2005. Unscheduled DNA synthesis: a functional assay for global genomic nucleotide excision repair. *Methods Mol Biol.* 291:303-20.
- Kemp, M.G., A.C. Mason, A. Carreira, J.T. Reardon, S.J. Haring, G.E. Borgstahl, S.C. Kowalczykowski, A. Sancar, and M.S. Wold. 2009. An alternative form of replication protein a expressed in normal human tissues supports DNA repair. *J Biol Chem.* 285:4788-97.
- Khanna, K.K., and S.P. Jackson. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 27:247-54.
- Kim, B.J., S.W. Ryu, and B.J. Song. 2006. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem.* 281:21256-65.
- Kim, E.K., and E.J. Choi. 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1802:396-405.

- Kim, G.Y., S.E. Mercer, D.Z. Ewton, Z. Yan, K. Jin, and E. Friedman. 2002. The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. *J Biol Chem.* 277:29792-802.
- Kim, J.K., and B.S. Choi. 1995. The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidyl(3'-->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement. *Eur J Biochem.* 228:849-54.
- Kim, S.M., A. Kumagai, J. Lee, and W.G. Dunphy. 2005. Phosphorylation of Chk1 by ATM- and Rad3-related (ATR) in *Xenopus* egg extracts requires binding of ATRIP to ATR but not the stable DNA-binding or coiled-coil domains of ATRIP. *J Biol Chem.* 280:38355-64.
- Kirschner, K., and D.W. Melton. 2010. Multiple roles of the ERCC1-XPF endonuclease in DNA repair and resistance to anticancer drugs. *Anticancer Res.* 30:3223-32.
- Kleijer, W.J., E.A. de Weerd-Kastelein, M.L. Sluyter, W. Keijzer, J. de Wit, and D. Bootsma. 1973. UV-induced DNA repair synthesis in cells of patients with different forms of xeroderma pigmentosum and of heterozygotes. *Mutat Res.* 20:417-28.
- Kleijer, W.J., V. Laugel, M. Berneburg, T. Nardo, H. Fawcett, A. Gratchev, N.G. Jaspers, A. Sarasin, M. Stefanini, and A.R. Lehmann. 2008. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst).* 7:744-50.
- Knebel, A., H.J. Rahmsdorf, A. Ullrich, and P. Herrlich. 1996. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *Embo J.* 15:5314-25.
- Knezevic, D., W. Zhang, P.J. Rochette, and D.E. Brash. 2007. Bcl-2 is the target of a UV-inducible apoptosis switch and a node for UV signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:11286-91.
- Kobayashi, N., S. Katsumi, K. Imoto, A. Nakagawa, S. Miyagawa, M. Furumura, and T. Mori. 2001. Quantitation and visualization of ultraviolet-induced DNA damage using specific antibodies: application to pigment cell biology. *Pigment Cell Res.* 14:94-102.
- Kondoh, K., and E. Nishida. 2007. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta.* 1773:1227-37.

- Kraemer, K.H., M.M. Lee, and J. Scotto. 1987. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol.* 123:241-50.
- Krokan, H.E., and M. Bjoras. 2013. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5:a012583.
- Kubbutat, M.H., S.N. Jones, and K.H. Vousden. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* 387:299-303.
- Kulms, D., B. Poppelmann, D. Yarosh, T.A. Luger, J. Krutmann, and T. Schwarz. 1999. Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:7974-9.
- Kunkel, T.A. 2004. DNA replication fidelity. *J Biol Chem.* 279:16895-8.
- Kunkel, T.A., and D.A. Erie. 2005. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem.* 74:681-710.
- Kuzminov, A. 2001. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:8241-6.
- Kvam, E., and R.M. Tyrrell. 1997. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis.* 18:2379-84.
- Kvam, E., and R.M. Tyrrell. 1999. The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 113:209-13.
- Kyriakis, J.M. 1999. Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *J Biol Chem.* 274:5259-62.
- Lagerwerf, S., M.G. Vrouwe, R.M. Overmeer, M.I. Fousteri, and L.H. Mullenders. 2011. DNA damage response and transcription. *DNA Repair (Amst).* 10:743-50.
- Lahav, G., N. Rosenfeld, A. Sigal, N. Geva-Zatorsky, A.J. Levine, M.B. Elowitz, and U. Alon. 2004. Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nat Genet.* 36:147-50.
- Lamb, J.A., J.J. Ventura, P. Hess, R.A. Flavell, and R.J. Davis. 2003. JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol Cell.* 11:1479-89.
- Lange, S.S., K. Takata, and R.D. Wood. 2011. DNA polymerases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 11:96-110.

- Laszlo, C.F., and S. Wu. 2008. Mechanism of UV-induced IkappaBalpha-independent activation of NF-kappaB. *Photochem Photobiol.* 84:1564-8.
- Lawrence, C.W. 2002. Cellular roles of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *DNA Repair (Amst)*. 1:425-35.
- Lee, C.M., D. Onesime, C.D. Reddy, N. Dhanasekaran, and E.P. Reddy. 2002. JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14189-94.
- Lee, D.H., and G.P. Pfeifer. 2003. Deamination of 5-methylcytosines within cyclobutane pyrimidine dimers is an important component of UVB mutagenesis. *J Biol Chem.* 278:10314-21.
- Lee, H., E. Popodi, H. Tang, and P.L. Foster. 2012a. Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:E2774-83.
- Lee, J.C., J.T. Laydon, P.C. McDonnell, T.F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M.J. Blumenthal, J.R. Heys, S.W. Landvatter, and et al. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.* 372:739-46.
- Lee, S., B. Elenbaas, A. Levine, and J. Griffith. 1995. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell.* 81:1013-20.
- Lee, T.H., J.M. Park, S.H. Leem, and T.H. Kang. 2012b. Coordinated regulation of XPA stability by ATR and HERC2 during nucleotide excision repair. *Oncogene.*
- Lehmann, A.R., and A.M. Carr. 1994. DNA damage, repair and the cell cycle. *Trends Cell Biol.* 4:24-6.
- Lehmann, A.R., S. Kirk-Bell, C.F. Arlett, M.C. Paterson, P.H. Lohman, E.A. de Weerd-Kastelein, and D. Bootsma. 1975. Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:219-23.
- Lehmann, A.R., D. McGibbon, and M. Stefanini. 2011. Xeroderma pigmentosum. *Orphanet J Rare Dis.* 6:70.

- Lehmann, A.R., A. Niimi, T. Ogi, S. Brown, S. Sabbioneda, J.F. Wing, P.L. Kannouche, and C.M. Green. 2007. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)*. 6:891-9.
- Lei, K., and R.J. Davis. 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:2432-7.
- Lemaire, D.G., and B.P. Ruzsicska. 1993. Kinetic analysis of the deamination reactions of cyclobutane dimers of thymidylyl-3',5'-2'-deoxycytidine and 2'-deoxycytidylyl-3',5'-thymidine. *Biochemistry*. 32:2525-33.
- Levine, A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 88:323-31.
- Li, J.P., J.C. Lin, and J.L. Yang. 2006. ERK activation in arsenite-treated G1-enriched CL3 cells contributes to survival, DNA repair inhibition, and micronucleus formation. *Toxicol Sci*. 89:164-72.
- Li, N., and M. Karin. 1998. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:13012-7.
- Li, R., S. Waga, G.J. Hannon, D. Beach, and B. Stillman. 1994. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*. 371:534-7.
- Li, Z., P.R. Musich, M.A. Serrano, Z. Dong, and Y. Zou. 2011a. XPA-mediated regulation of global nucleotide excision repair by ATR Is p53-dependent and occurs primarily in S-phase. *PLoS One*. 6:e28326.
- Li, Z., P.R. Musich, and Y. Zou. 2011b. Differential DNA damage responses in p53 proficient and deficient cells: cisplatin-induced nuclear import of XPA is independent of ATR checkpoint in p53-deficient lung cancer cells. *Int J Biochem Mol Biol*. 2:138-145.
- Lieber, M.R., Y. Ma, U. Pannicke, and K. Schwarz. 2004. The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)*. 3:817-26.
- Limoli, C.L., E. Giedzinski, W.F. Morgan, and J.E. Cleaver. 2000. Polymerase eta deficiency in the xeroderma pigmentosum variant uncovers an overlap between the S phase checkpoint and double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:7939-46.
- Lin, A. 2003. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*. 25:17-24.

- Lin, Y.L., S. Sengupta, K. Gurdziel, G.W. Bell, T. Jacks, and E.R. Flores. 2009. p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair. *PLoS Genet.* 5:e1000680.
- Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 362:709-15.
- Little, N.A., and A.G. Jochemsen. 2001. Hdmx and Mdm2 can repress transcription activation by p53 but not by p63. *Oncogene.* 20:4576-80.
- Liu, H., S.R. Hewitt, and J.B. Hays. 2000a. Antagonism of ultraviolet-light mutagenesis by the methyl-directed mismatch-repair system of Escherichia coli. *Genetics.* 154:503-12.
- Liu, J., and A. Lin. 2005. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res.* 15:36-42.
- Liu, Q., S. Guntuku, X.S. Cui, S. Matsuoka, D. Cortez, K. Tamai, G. Luo, S. Carattini-Rivera, F. DeMayo, A. Bradley, L.A. Donehower, and S.J. Elledge. 2000b. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 14:1448-59.
- Liu, X., S. Yan, T. Zhou, Y. Terada, and R.L. Erikson. 2004. The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival. *Oncogene.* 23:763-76.
- Livneh, Z., O. Ziv, and S. Shachar. 2010. Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. *Cell Cycle.* 9:729-35.
- Lloyd, D.R., and P.C. Hanawalt. 2002. p53 controls global nucleotide excision repair of low levels of structurally diverse benzo(g)chrysene-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer Res.* 62:5288-94.
- Lo, H.L., S. Nakajima, L. Ma, B. Walter, A. Yasui, D.W. Ethell, and L.B. Owen. 2005. Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. *BMC Cancer.* 5:135.
- Loignon, M., and E.A. Drobetsky. 2002. The initiation of UV-induced G(1) arrest in human cells is independent of the p53/p21/pRb pathway but can be attenuated through expression of the HPV E7 oncoprotein. *Carcinogenesis.* 23:35-45.
- Loignon, M., R. Fetni, A.J. Gordon, and E.A. Drobetsky. 1997. A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res.* 57:3390-4.

- Lomas, D.A., D.A. Lipson, B.E. Miller, L. Willits, O. Keene, H. Barnacle, N.C. Barnes, and R. Tal-Singer. 2012. An oral inhibitor of p38 MAP kinase reduces plasma fibrinogen in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Pharmacol.* 52:416-24.
- Lu, X., and D.P. Lane. 1993. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell.* 75:765-78.
- Luijsterburg, M.S., M. Lindh, K. Acs, M.G. Vrouwe, A. Pines, H. van Attikum, L.H. Mullenders, and N.P. Dantuma. 2012. DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J Cell Biol.* 197:267-81.
- MacCorkle, R.A., and T.H. Tan. 2005. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. *Cell Biochem Biophys.* 43:451-61.
- MacDougall, C.A., T.S. Byun, C. Van, M.C. Yee, and K.A. Cimprich. 2007. The structural determinants of checkpoint activation. *Genes Dev.* 21:898-903.
- Mahaney, B.L., K. Meek, and S.P. Lees-Miller. 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J.* 417:639-50.
- Manke, I.A., A. Nguyen, D. Lim, M.Q. Stewart, A.E. Elia, and M.B. Yaffe. 2005. MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell.* 17:37-48.
- Mao, Z., M. Bozzella, A. Seluanov, and V. Gorbunova. 2008. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle.* 7:2902-6.
- Marshall, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80:179-85.
- Masutani, C., M. Araki, A. Yamada, R. Kusumoto, T. Nogimori, T. Maekawa, S. Iwai, and F. Hanaoka. 1999a. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *Embo J.* 18:3491-501.
- Masutani, C., R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio, and F. Hanaoka. 1999b. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature.* 399:700-4.

- Mathieu, N., N. Kaczmarek, and H. Naegeli. 2010. Strand- and site-specific DNA lesion demarcation by the xeroderma pigmentosum group D helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:17545-50.
- Mathonnet, G., C. Leger, J. Desnoyers, R. Drouin, J.P. Therrien, and E.A. Drobetsky. 2003. UV wavelength-dependent regulation of transcription-coupled nucleotide excision repair in p53-deficient human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:7219-24.
- Matsunaga, T., Y. Hatakeyama, M. Ohta, T. Mori, and O. Nikaido. 1993. Establishment and characterization of a monoclonal antibody recognizing the Dewar isomers of (6-4)photoproducts. *Photochem Photobiol*. 57:934-40.
- Matsuoka, S., B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, 3rd, K.E. Hurov, J. Luo, C.E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S.P. Gygi, and S.J. Elledge. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 316:1160-6.
- McCulloch, S.D., R.J. Kokoska, C. Masutani, S. Iwai, F. Hanaoka, and T.A. Kunkel. 2004. Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase eta occurs with biased fidelity. *Nature*. 428:97-100.
- McDonald, J.P., E.G. Frank, B.S. Plosky, I.B. Rogozin, C. Masutani, F. Hanaoka, R. Woodgate, and P.J. Gearhart. 2003. 129-derived strains of mice are deficient in DNA polymerase iota and have normal immunoglobulin hypermutation. *J Exp Med*. 198:635-43.
- McDonald, P.H., C.W. Chow, W.E. Miller, S.A. Laporte, M.E. Field, F.T. Lin, R.J. Davis, and R.J. Lefkowitz. 2000. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science*. 290:1574-7.
- McGregor, W.G., D. Wei, V.M. Maher, and J.J. McCormick. 1999. Abnormal, error-prone bypass of photoproducts by xeroderma pigmentosum variant cell extracts results in extreme strand bias for the kinds of mutations induced by UV light. *Mol Cell Biol*. 19:147-54.
- McNally, K., J.A. Neal, T.P. McManus, J.J. McCormick, and V.M. Maher. 2008. hRev7, putative subunit of hPolzeta, plays a critical role in survival, induction of mutations, and progression through S-phase, of UV((254nm))-irradiated human fibroblasts. *DNA Repair (Amst)*. 7:597-604.

- Mellon, I., G. Spivak, and P.C. Hanawalt. 1987. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*. 51:241-9.
- Melnikova, V.O., and H.N. Ananthaswamy. 2005. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat Res*. 571:91-106.
- Melo, A.N., and C.M. Eischen. 2012. Protecting the genome from mdm2 and mdmx. *Genes Cancer*. 3:283-90.
- Memisoglu, A., and L. Samson. 2000. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res*. 451:39-51.
- Mikhailov, A., M. Shinohara, and C.L. Rieder. 2005. The p38-mediated stress-activated checkpoint. A rapid response system for delaying progression through antephasis and entry into mitosis. *Cell Cycle*. 4:57-62.
- Minden, A., A. Lin, T. Smeal, B. Derijard, M. Cobb, R. Davis, and M. Karin. 1994. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol*. 14:6683-8.
- Mingo-Sion, A.M., P.M. Marietta, E. Koller, D.M. Wolf, and C.L. Van Den Berg. 2004. Inhibition of JNK reduces G2/M transit independent of p53, leading to endoreduplication, decreased proliferation, and apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. 23:596-604.
- Miotto, B., and K. Struhl. 2011. JNK1 phosphorylation of Cdt1 inhibits recruitment of HBO1 histone acetylase and blocks replication licensing in response to stress. *Mol Cell*. 44:62-71.
- Missura, M., T. Buterin, R. Hindges, U. Hubscher, J. Kasparkova, V. Brabec, and H. Naegeli. 2001. Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair. *Embo J*. 20:3554-64.
- Mitchell, D.L. 1988. The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem Photobiol*. 48:51-7.
- Mitchell, D.L., and J.M. Clarkson. 1981. The development of a radioimmunoassay for the detection of photoproducts in mammalian cell DNA. *Biochim Biophys Acta*. 655:54-60.

- Mitchell, D.L., J.E. Cleaver, M.P. Lowery, and R.R. Hewitt. 1995. Induction and repair of (6-4) photoproducts in normal human and xeroderma pigmentosum variant cells during the cell cycle. *Mutat Res.* 337:161-7.
- Mitchell, D.L., C.A. Haipek, and J.M. Clarkson. 1985. (6-4)Photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutat Res.* 143:109-12.
- Mitchell, D.L., C.A. Haipek, and J.M. Clarkson. 1987. Xeroderma pigmentosum variant cells are not defective in the repair of (6-4) photoproducts. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 52:201-5.
- Mitchell, D.L., and R.S. Nairn. 1989. The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol.* 49:805-19.
- Moon, A.F., M. Garcia-Diaz, V.K. Batra, W.A. Beard, K. Bebenek, T.A. Kunkel, S.H. Wilson, and L.C. Pedersen. 2007. The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases. *DNA Repair (Amst).* 6:1709-25.
- Mori, T., M. Nakane, T. Hattori, T. Matsunaga, M. Ihara, and O. Nikaido. 1991. Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4)photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA. *Photochem Photobiol.* 54:225-32.
- Moriwaki, S., and K.H. Kraemer. 2001. Xeroderma pigmentosum--bridging a gap between clinic and laboratory. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 17:47-54.
- Morrison, D.K., and R.J. Davis. 2003. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:91-118.
- Morton, S., R.J. Davis, A. McLaren, and P. Cohen. 2003. A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *Embo J.* 22:3876-86.
- Moser, J., H. Kool, I. Giakzidis, K. Caldecott, L.H. Mullenders, and M.I. Fousteri. 2007. Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell.* 27:311-23.
- Mouret, S., C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, and T. Douki. 2006. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:13765-70.

- Muniandy, P.A., J. Liu, A. Majumdar, S.T. Liu, and M.M. Seidman. 2010. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 45:23-49.
- Munoz, L., and A.J. Ammit. 2010. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 58:561-8.
- Murga, M., I. Jaco, Y. Fan, R. Soria, B. Martinez-Pastor, M. Cuadrado, S.M. Yang, M.A. Blasco, A.I. Skoultchi, and O. Fernandez-Capetillo. 2007. Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *J Cell Biol.* 178:1101-8.
- Nakagawa, S., T. Ohtani, M. Mizuashi, Z.U. Mollah, Y. Ito, H. Tagami, and S. Aiba. 2004. p38 Mitogen-Activated protein kinase mediates dual role of ultraviolet B radiation in induction of maturation and apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 123:361-70.
- Nakazawa, Y., K. Sasaki, N. Mitsutake, M. Matsuse, M. Shimada, T. Nardo, Y. Takahashi, K. Ohyama, K. Ito, H. Mishima, M. Nomura, A. Kinoshita, S. Ono, K. Takenaka, R. Masuyama, T. Kudo, H. Slor, A. Utani, S. Tateishi, S. Yamashita, M. Stefanini, A.R. Lehmann, K. Yoshiura, and T. Ogi. 2012. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Genet.* 44:586-92.
- Natale, V. 2011. A comprehensive description of the severity groups in Cockayne syndrome. *Am J Med Genet A.* 155A:1081-95.
- Nemoto, S., J. Xiang, S. Huang, and A. Lin. 1998. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 273:16415-20.
- Newman, J.C., A.D. Bailey, and A.M. Weiner. 2006. Cockayne syndrome group B protein (CSB) plays a general role in chromatin maintenance and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:9613-8.
- Nishi, R., Y. Okuda, E. Watanabe, T. Mori, S. Iwai, C. Masutani, K. Sugawara, and F. Hanaoka. 2005. Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol Cell Biol.* 25:5664-74.
- Nitta, R.T., A.H. Chu, and A.J. Wong. 2008. Constitutive activity of JNK2 alpha2 is dependent on a unique mechanism of MAPK activation. *J Biol Chem.* 283:34935-45.

- Nomura, M., A. Kaji, W.Y. Ma, S. Zhong, G. Liu, G.T. Bowden, K.I. Miyamoto, and Z. Dong. 2001. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates activation of Akt by ultraviolet B irradiation. *J Biol Chem.* 276:25558-67.
- Nouspikel, T. 2009. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci.* 66:994-1009.
- Oakley, G.G., and S.M. Patrick. 2010. Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair. *Front Biosci.* 15:883-900.
- O'Driscoll, M., W.B. Dobyns, J.M. van Hagen, and P.A. Jeggo. 2007. Cellular and clinical impact of haploinsufficiency for genes involved in ATR signaling. *Am J Hum Genet.* 81:77-86.
- O'Driscoll, M., and P.A. Jeggo. 2003. Clinical impact of ATR checkpoint signalling failure in humans. *Cell Cycle.* 2:194-5.
- O'Driscoll, M., V.L. Ruiz-Perez, C.G. Woods, P.A. Jeggo, and J.A. Goodship. 2003. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet.* 33:497-501.
- Ogi, T., and A.R. Lehmann. 2006. The Y-family DNA polymerase kappa (pol kappa) functions in mammalian nucleotide-excision repair. *Nat Cell Biol.* 8:640-2.
- Ogi, T., S. Limsirichaikul, R.M. Overmeer, M. Volker, K. Takenaka, R. Cloney, Y. Nakazawa, A. Niimi, Y. Miki, N.G. Jaspers, L.H. Mullenders, S. Yamashita, M.I. Foustari, and A.R. Lehmann. 2010. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol Cell.* 37:714-27.
- Oh, D.H., and K. Yeh. 2005. Differentiating human keratinocytes are deficient in p53 but retain global nucleotide excision repair following ultraviolet radiation. *DNA Repair (Amst).* 4:1149-59.
- Oh, K.S., K. Imoto, S. Emmert, D. Tamura, J.J. DiGiovanna, and K.H. Kraemer. 2011. Nucleotide excision repair proteins rapidly accumulate but fail to persist in human XP-E (DDB2 mutant) cells. *Photochem Photobiol.* 87:729-33.
- Oksvold, M.P., H.S. Huitfeldt, A.C. Ostvold, and E. Skarpen. 2002. UV induces tyrosine kinase-independent internalisation and endosome arrest of the EGF receptor. *J Cell Sci.* 115:793-803.

- Okuda, Y., R. Nishi, J.M. Ng, W. Vermeulen, G.T. van der Horst, T. Mori, J.H. Hoeijmakers, F. Hanaoka, and K. Sugawara. 2004. Relative levels of the two mammalian Rad23 homologs determine composition and stability of the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)*. 3:1285-95.
- Olivier, M., D.E. Goldgar, N. Sodha, H. Ohgaki, P. Kleihues, P. Hainaut, and R.A. Eeles. 2003. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res*. 63:6643-50.
- Olson, E., C.J. Nievera, A.Y. Lee, L. Chen, and X. Wu. 2007. The Mre11-Rad50-Nbs1 complex acts both upstream and downstream of ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related protein (ATR) to regulate the S-phase checkpoint following UV treatment. *J Biol Chem*. 282:22939-52.
- Ostenfeld, T., A. Krishen, R.Y. Lai, J. Bullman, A.J. Baines, J. Green, P. Anand, and M. Kelly. 2012. Analgesic efficacy and safety of the novel p38 MAP kinase inhibitor, losmapimod, in patients with neuropathic pain following peripheral nerve injury: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Pain*.
- Otoshi, E., T. Yagi, T. Mori, T. Matsunaga, O. Nikaido, S.T. Kim, K. Hitomi, M. Ikenaga, and T. Todo. 2000. Respective roles of cyclobutane pyrimidine dimers, (6-4)photoproducts, and minor photoproducts in ultraviolet mutagenesis of repair-deficient xeroderma pigmentosum A cells. *Cancer Res*. 60:1729-35.
- Otsu, N. 1979. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans. on Syst. Man. Cybern., PART B*. 9:62-666.
- Overmeer, R.M., A.M. Gourdin, A. Giglia-Mari, H. Kool, A.B. Houtsmuller, G. Siegal, M.I. Fousteri, L.H. Mullenders, and W. Vermeulen. 2010. Replication factor C recruits DNA polymerase delta to sites of nucleotide excision repair but is not required for PCNA recruitment. *Mol Cell Biol*. 30:4828-39.
- Overmeer, R.M., J. Moser, M. Volker, H. Kool, A.E. Tomkinson, A.A. van Zeeland, L.H. Mullenders, and M. Fousteri. 2011. Replication protein A safeguards genome integrity by controlling NER incision events. *J Cell Biol*. 192:401-15.
- Pages, G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J.C. Chambard, S. Meloche, and J. Pouyssegur. 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:8319-23.

- Painter, R.B., and J.E. Cleaver. 1969. Repair replication, unscheduled DNA synthesis, and the repair of mammalian DNA. *Radiat Res.* 37:451-66.
- Painter, R.B., and B.R. Young. 1980. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:7315-7.
- Pakotiprapha, D., M. Samuels, K. Shen, J.H. Hu, and D. Jeruzalmi. 2012. Structure and mechanism of the UvrA-UvrB DNA damage sensor. *Nat Struct Mol Biol.* 19:291-8.
- Park, H., K. Zhang, Y. Ren, S. Nadjji, N. Sinha, J.S. Taylor, and C. Kang. 2002a. Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:15965-70.
- Park, J.M., F.R. Greten, Z.W. Li, and M. Karin. 2002b. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science.* 297:2048-51.
- Patel, R., B. Bartosch, and J.L. Blank. 1998. p21WAF1 is dynamically associated with JNK in human T-lymphocytes during cell cycle progression. *J Cell Sci.* 111 ( Pt 15):2247-55.
- Pathania, S., J. Nguyen, S.J. Hill, R. Scully, G.O. Adelmant, J.A. Marto, J. Feunteun, and D.M. Livingston. 2011. BRCA1 is required for postreplication repair after UV-induced DNA damage. *Mol Cell.* 44:235-51.
- Pattison, D.I., and M.J. Davies. 2006. Actions of ultraviolet light on cellular structures. *Exs:*131-57.
- Pedrali-Noy, G., S. Spadari, A. Miller-Faures, A.O. Miller, J. Kruppa, and G. Koch. 1980. Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase alpha with aphidicolin. *Nucleic Acids Res.* 8:377-87.
- Peng, W., and B.R. Shaw. 1996. Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers leads to CC-->TT transitions. *Biochemistry.* 35:10172-81.
- Perdiz, D., P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi, and E. Sage. 2000. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem.* 275:26732-42.
- Perou, C.M., and A.L. Borresen-Dale. 2011. Systems biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.

- Peterson, L.A. 2010. Formation, repair, and genotoxic properties of bulky DNA adducts formed from tobacco-specific nitrosamines. *J Nucleic Acids*. 2010.
- Pettijohn, D., and P. Hanawalt. 1964. Evidence for Repair-Replication of Ultraviolet Damaged DNA in Bacteria. *J Mol Biol*. 9:395-410.
- Pfeifer, G.P., R. Drouin, and G.P. Holmquist. 1993. Detection of DNA adducts at the DNA sequence level by ligation-mediated PCR. *Mutat Res*. 288:39-46.
- Pfeifer, G.P., R. Drouin, A.D. Riggs, and G.P. Holmquist. 1991. In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:1374-8.
- Pfeifer, G.P., R. Drouin, A.D. Riggs, and G.P. Holmquist. 1992. Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo. *Mol Cell Biol*. 12:1798-804.
- Pitsikas, P., M.A. Francis, and A.J. Rainbow. 2005. Enhanced host cell reactivation of a UV-damaged reporter gene in pre-UV-treated cells is delayed in Cockayne syndrome cells. *J Photochem Photobiol B*. 81:89-97.
- Podmore, I.D., M.S. Cooke, K.E. Herbert, and J. Lunec. 1996. Quantitative determination of cyclobutane thymine dimers in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *Photochem Photobiol*. 64:310-5.
- Politi, A., M.J. Mone, A.B. Houtsmuller, D. Hoogstraten, W. Vermeulen, R. Heinrich, and R. van Driel. 2005. Mathematical modeling of nucleotide excision repair reveals efficiency of sequential assembly strategies. *Mol Cell*. 19:679-90.
- Porras, A., S. Zuluaga, E. Black, A. Valladares, A.M. Alvarez, C. Ambrosino, M. Benito, and A.R. Nebreda. 2004. P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell*. 15:922-33.
- Potapova, O., M. Gorospe, F. Bost, N.M. Dean, W.A. Gaarde, D. Mercola, and N.J. Holbrook. 2000a. c-Jun N-terminal kinase is essential for growth of human T98G glioblastoma cells. *J Biol Chem*. 275:24767-75.
- Potapova, O., M. Gorospe, R.H. Dougherty, N.M. Dean, W.A. Gaarde, and N.J. Holbrook. 2000b. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner. *Mol Cell Biol*. 20:1713-22.

- Potapova, O., A. Haghghi, F. Bost, C. Liu, M.J. Birrer, R. Gjerset, and D. Mercola. 1997. The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin. *J Biol Chem.* 272:14041-4.
- Proietti-De-Santis, L., P. Drane, and J.M. Egly. 2006. Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *Embo J.* 25:1915-23.
- Protic-Sabljić, M., and K.H. Kraemer. 1985. One pyrimidine dimer inactivates expression of a transfected gene in xeroderma pigmentosum cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:6622-6.
- Pumiglia, K.M., and S.J. Decker. 1997. Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:448-52.
- Qiao, Y., M.R. Spitz, H. Shen, Z. Guo, S. Shete, M. Hedayati, L. Grossman, H. Mohrenweiser, and Q. Wei. 2002. Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis.* 23:295-9.
- Qin, B., B. Gao, J. Yu, J. Yuan, and Z. Lou. 2013. Ataxia telangiectasia-mutated- and Rad3-related protein regulates the DNA damage-induced G2/M checkpoint through the Aurora A cofactor Bora protein. *J Biol Chem.* 288:16139-44.
- Raingeaud, J., A.J. Whitmarsh, T. Barrett, B. Derijard, and R.J. Davis. 1996. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol.* 16:1247-55.
- Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 26:3100-12.
- Rasmussen, R.E., and R.B. Painter. 1964. Evidence for Repair of Ultra-Violet Damaged Deoxyribonucleic Acid in Cultured Mammalian Cells. *Nature.* 203:1360-2.
- Rass, U., S.A. Compton, J. Matos, M.R. Singleton, S.C. Ip, M.G. Blanco, J.D. Griffith, and S.C. West. 2010. Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes Dev.* 24:1559-69.
- Rastogi, R.P., Richa, A. Kumar, M.B. Tyagi, and R.P. Sinha. 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids.* 2010:592980.

- Rattray, A.J., and J.N. Strathern. 2005. Homologous recombination is promoted by translesion polymerase poleta. *Mol Cell*. 20:658-9.
- Ravanat, J.L., P. Di Mascio, G.R. Martinez, M.H. Medeiros, and J. Cadet. 2000. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J Biol Chem*. 275:40601-4.
- Ravanat, J.L., T. Douki, and J. Cadet. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*. 63:88-102.
- Ravanat, J.L., S. Sauvaigo, S. Caillat, G.R. Martinez, M.H. Medeiros, P. Di Mascio, A. Favier, and J. Cadet. 2004. Singlet oxygen-mediated damage to cellular DNA determined by the comet assay associated with DNA repair enzymes. *Biol Chem*. 385:17-20.
- Ray, L.B., and T.W. Sturgill. 1988. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:3753-7.
- Reardon, J.T., and A. Sancar. 2003. Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease. *Genes Dev*. 17:2539-51.
- Redmond, R.W., and J.N. Gamlin. 1999. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem Photobiol*. 70:391-475.
- Reilly, J.F., and P.A. Maher. 2001. Importin beta-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation. *J Cell Biol*. 152:1307-12.
- Reinhardt, H.C., A.S. Aslanian, J.A. Lees, and M.B. Yaffe. 2007. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell*. 11:175-89.
- Reinhardt, H.C., and M.B. Yaffe. 2009. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol*. 21:245-55.
- Renaud, E., and F. Rosselli. 2013. FANC pathway promotes UV-induced stalled replication forks recovery by acting both upstream and downstream Poleta and Rev1. *PLoS One*. 8:e53693.
- Robbins, D.J., E. Zhen, M. Cheng, S. Xu, C.A. Vanderbilt, D. Ebert, C. Garcia, A. Dang, and M.H. Cobb. 1993. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1, 2, and 3. *J Am Soc Nephrol*. 4:1104-10.

- Robertson, A.B., A. Klungland, T. Rognes, and I. Leiros. 2009. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci.* 66:981-93.
- Roduit, R., and D.F. Schorderet. 2008. MAP kinase pathways in UV-induced apoptosis of retinal pigment epithelium ARPE19 cells. *Apoptosis.* 13:343-53.
- Ronen, A., and B.W. Glickman. 2001. Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen.* 37:241-83.
- Roovers, K., and R.K. Assoian. 2000. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays.* 22:818-26.
- Rosen, J.E., A.K. Prahalad, and G.M. Williams. 1996. 8-Oxodeoxyguanosine formation in the DNA of cultured cells after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone or with UVB or UVA irradiation. *Photochem Photobiol.* 64:117-22.
- Rosette, C., and M. Karin. 1996. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science.* 274:1194-7.
- Rouget, R., Y. Auclair, M. Loinjon, B. Affar el, and E.A. Drobetsky. 2008. A sensitive flow cytometry-based nucleotide excision repair assay unexpectedly reveals that mitogen-activated protein kinase signaling does not regulate the removal of UV-induced DNA damage in human cells. *J Biol Chem.* 283:5533-41.
- Rouget, R., F. Vigneault, C. Codio, C. Rochette, I. Paradis, R. Drouin, and L.R. Simard. 2005. Characterization of the survival motor neuron (SMN) promoter provides evidence for complex combinatorial regulation in undifferentiated and differentiated P19 cells. *Biochem J.* 385:433-43.
- Roux, P.P., and J. Blenis. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68:320-44.
- Roy, F., G. Laberge, M. Douziech, D. Ferland-McCollough, and M. Therrien. 2002. KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev.* 16:427-38.
- Roy, F., and M. Therrien. 2002. MAP kinase module: the Ksr connection. *Curr Biol.* 12:R325-7.
- Rubbi, C.P., and J. Milner. 2003. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J.* 22:975-86.

- Rude, J.M., and E.C. Friedberg. 1977. Semi-conservative deoxyribonucleic acid synthesis in unirradiated and ultraviolet-irradiated xeroderma pigmentosum and normal human skin fibroblasts. *Mutat Res.* 42:433-42.
- Ruiz de Almodovar, J.M., G.G. Steel, S.J. Whitaker, and T.J. McMillan. 1994. A comparison of methods for calculating DNA double-strand break induction frequency in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol.* 65:641-9.
- Rundell, M.S., E.D. Wagner, and M.J. Plewa. 2003. The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation? *Environ Mol Mutagen.* 42:61-7.
- Sachsenmaier, C., A. Radler-Pohl, A. Muller, P. Herrlich, and H.J. Rahmsdorf. 1994a. Damage to DNA by UV light and activation of transcription factors. *Biochem Pharmacol.* 47:129-36.
- Sachsenmaier, C., A. Radler-Pohl, R. Zinck, A. Nordheim, P. Herrlich, and H.J. Rahmsdorf. 1994b. Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell.* 78:963-72.
- Saijo, M. 2013. The role of Cockayne syndrome group A (CSA) protein in transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mech Ageing Dev.*
- Saijo, M., A. Takedachi, and K. Tanaka. 2011. Nucleotide excision repair by mutant xeroderma pigmentosum group A (XPA) proteins with deficiency in interaction with RPA. *J Biol Chem.* 286:5476-83.
- Sale, J.E. 2012. Competition, collaboration and coordination--determining how cells bypass DNA damage. *J Cell Sci.* 125:1633-43.
- Sale, J.E., A.R. Lehmann, and R. Woodgate. 2012. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:141-52.
- Salh, B. 2007. c-Jun N-terminal kinases as potential therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets.* 11:1339-53.
- Sancar, A. 1996. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem.* 65:43-81.
- Sanchez, Y., C. Wong, R.S. Thoma, R. Richman, Z. Wu, H. Piwnica-Worms, and S.J. Elledge. 1997. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science.* 277:1497-501.
- Sarasin, A. 2012. UVSSA and USP7: new players regulating transcription-coupled nucleotide excision repair in human cells. *Genome Med.* 4:44.

- Sauvaigo, S., C. Serres, N. Signorini, N. Emonet, M.J. Richard, and J. Cadet. 1998. Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Anal Biochem.* 259:1-7.
- Savitsky, K., S. Sfez, D.A. Tagle, Y. Ziv, A. Sartiel, F.S. Collins, Y. Shiloh, and G. Rotman. 1995. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet.* 4:2025-32.
- Scheffner, M., B.A. Werness, J.M. Huibregtse, A.J. Levine, and P.M. Howley. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63:1129-36.
- Schreier, W.J., T.E. Schrader, F.O. Koller, P. Gilch, C.E. Crespo-Hernandez, V.N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, and B. Kohler. 2007. Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction. *Science.* 315:625-9.
- Schwarz, T. 1998. UV light affects cell membrane and cytoplasmic targets. *J Photochem Photobiol B.* 44:91-6.
- Schwertman, P., A. Lagarou, D.H. Dekkers, A. Raams, A.C. van der Hoek, C. Laffeber, J.H. Hoeijmakers, J.A. Demmers, M. Fouteri, W. Vermeulen, and J.A. Marteijn. 2012. UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. *Nat Genet.* 44:598-602.
- Scrima, A., R. Konickova, B.K. Czyzewski, Y. Kawasaki, P.D. Jeffrey, R. Groisman, Y. Nakatani, S. Iwai, N.P. Pavletich, and N.H. Thoma. 2008. Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell.* 135:1213-23.
- Sebolt-Leopold, J.S. 2004. MEK inhibitors: a therapeutic approach to targeting the Ras-MAP kinase pathway in tumors. *Curr Pharm Des.* 10:1907-14.
- Sebolt-Leopold, J.S., and R. Herrera. 2004. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer.* 4:937-47.
- Sengupta, S., and C.C. Harris. 2005. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:44-55.
- Setlow, R.B., and W.L. Carrier. 1964. The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: An Error-Correcting Mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 51:226-31.

- Setlow, R.B., J.D. Regan, J. German, and W.L. Carrier. 1969. Evidence that xeroderma pigmentosum cells do not perform the first step in the repair of ultraviolet damage to their DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 64:1035-41.
- Shachar, S., O. Ziv, S. Avkin, S. Adar, J. Wittschieben, T. Reissner, S. Chaney, E.C. Friedberg, Z. Wang, T. Carell, N. Geacintov, and Z. Livneh. 2009. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *Embo J*. 28:383-93.
- Shaulian, E., and M. Karin. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 4:E131-6.
- She, Q.B., N. Chen, and Z. Dong. 2000. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem*. 275:20444-9.
- Shell, S.M., Z. Li, N. Shkriabai, M. Kvaratskhelia, C. Brosey, M.A. Serrano, W.J. Chazin, P.R. Musich, and Y. Zou. 2009. Checkpoint kinase ATR promotes nucleotide excision repair of UV-induced DNA damage via physical interaction with xeroderma pigmentosum group A. *J Biol Chem*. 284:24213-22.
- Shieh, S.Y., M. Ikeda, Y. Taya, and C. Prives. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*. 91:325-34.
- Shigechi, T., J. Tomida, K. Sato, M. Kobayashi, J.K. Eykelenboom, F. Pessina, Y. Zhang, E. Uchida, M. Ishiai, N.F. Lowndes, K. Yamamoto, H. Kurumizaka, Y. Maehara, and M. Takata. 2012. ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Cancer Res*. 72:1149-56.
- Shivji, K.K., M.K. Kenny, and R.D. Wood. 1992. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*. 69:367-74.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, and E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 175:184-91.
- Sinha, R.P., and D.P. Hader. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci*. 1:225-36.
- Slebos, R.J., and J.A. Taylor. 2001. A novel host cell reactivation assay to assess homologous recombination capacity in human cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 281:212-9.

- Smith, M.L., I.T. Chen, Q. Zhan, P.M. O'Connor, and A.J. Fornace, Jr. 1995. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene*. 10:1053-9.
- Smith, M.L., and M.A. Kumar. 2010. The "Two faces" of Tumor Suppressor p53-revisited. *Mol Cell Pharmacol*. 2:117-119.
- Solimando, L., M.S. Luijsterburg, L. Vecchio, W. Vermeulen, R. van Driel, and S. Fakan. 2009. Spatial organization of nucleotide excision repair proteins after UV-induced DNA damage in the human cell nucleus. *J Cell Sci*. 122:83-91.
- Song, J.J., and Y.J. Lee. 2007. Differential activation of the JNK signal pathway by UV irradiation and glucose deprivation. *Cell Signal*. 19:563-72.
- Spivak, G., R.A. Cox, and P.C. Hanawalt. 2009. New applications of the Comet assay: Comet-FISH and transcription-coupled DNA repair. *Mutat Res*. 681:44-50.
- Stang, A., M. Brendamour, C. Schunck, and I. Witte. 2010. Automated analysis of DNA damage in the high-throughput version of the comet assay. *Mutat Res*. 698:1-5.
- Stark, G.R., and W.R. Taylor. 2006. Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol*. 32:227-48.
- Stry, A., P. Kannouche, A.R. Lehmann, and A. Sarasin. 2003. Role of DNA polymerase eta in the UV mutation spectrum in human cells. *J Biol Chem*. 278:18767-75.
- Stry, A., and A. Sarasin. 1996. The genetic basis of xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy syndromes. *Cancer Surv*. 26:155-71.
- Stiff, T., C. Reis, G.K. Alderton, L. Woodbine, M. O'Driscoll, and P.A. Jeggo. 2005. Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. *Embo J*. 24:199-208.
- Stiff, T., S.A. Walker, K. Cerosaletti, A.A. Goodarzi, E. Petermann, P. Concannon, M. O'Driscoll, and P.A. Jeggo. 2006. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *Embo J*. 25:5775-82.
- Stokes, G.Y., J.M. Gibbs-Davis, F.C. Boman, B.R. Stepp, A.G. Condie, S.T. Nguyen, and F.M. Geiger. 2007a. Making "sense" of DNA. *J Am Chem Soc*. 129:7492-3.
- Stokes, M.P., J. Rush, J. Macneill, J.M. Ren, K. Sprott, J. Nardone, V. Yang, S.A. Beausoleil, S.P. Gygi, M. Livingstone, H. Zhang, R.D. Polakiewicz, and M.J. Comb. 2007b. Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:19855-60.

- Strazewski, P. 1988. Mismatch formation in DNA can involve rare tautomeric forms in the template. *Nucleic Acids Res.* 16:9377-98.
- Sturgill, T.W., L.B. Ray, E. Erikson, and J.L. Maller. 1988. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature.* 334:715-8.
- Sugasawa, K. 2006. UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDB-ubiquitin ligase complex, and DNA repair. *J Mol Biol.* 37:189-202.
- Sugasawa, K., J. Akagi, R. Nishi, S. Iwai, and F. Hanaoka. 2009. Two-step recognition of DNA damage for mammalian nucleotide excision repair: Directional binding of the XPC complex and DNA strand scanning. *Mol Cell.* 36:642-53.
- Sugasawa, K., J.M. Ng, C. Masutani, S. Iwai, P.J. van der Spek, A.P. Eker, F. Hanaoka, D. Bootsma, and J.H. Hoeijmakers. 1998. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell.* 2:223-32.
- Sugasawa, K., Y. Okuda, M. Saijo, R. Nishi, N. Matsuda, G. Chu, T. Mori, S. Iwai, K. Tanaka, and F. Hanaoka. 2005. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell.* 121:387-400.
- Sugasawa, K., Y. Shimizu, S. Iwai, and F. Hanaoka. 2002. A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst).* 1:95-107.
- Sutherland, B.M., P.V. Bennett, O. Sidorkina, and J. Laval. 2000. Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry.* 39:8026-31.
- Svejstrup, J.Q., Z. Wang, W.J. Feaver, X. Wu, D.A. Bushnell, T.F. Donahue, E.C. Friedberg, and R.D. Kornberg. 1995. Different forms of TFIIH for transcription and DNA repair: holo-TFIIH and a nucleotide excision repairosome. *Cell.* 80:21-8.
- Takekawa, M., K. Tatebayashi, and H. Saito. 2005. Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol Cell.* 18:295-306.
- Takemura, H., H. Nagayoshi, T. Matsuda, H. Sakakibara, M. Morita, A. Matsui, T. Ohura, and K. Shimoi. 2010. Inhibitory effects of chrysoeriol on DNA adduct formation with benzo[a]pyrene in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology.* 274:42-8.

- Takenaka, K., T. Moriguchi, and E. Nishida. 1998. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. *Science*. 280:599-602.
- Tang, J., and G. Chu. 2002. Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair (Amst)*. 1:601-16.
- Tanioka, M., T. Masaki, R. Ono, T. Nagano, E. Otsoshi-Honda, Y. Matsumura, M. Takigawa, H. Inui, Y. Miyachi, S. Moriwaki, and C. Nishigori. 2007. Molecular analysis of DNA polymerase eta gene in Japanese patients diagnosed as xeroderma pigmentosum variant type. *J Invest Dermatol*. 127:1745-51.
- Tanoue, T., and E. Nishida. 2003. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal*. 15:455-62.
- Taylor, J.S., H.F. Lu, and J.J. Kotyk. 1990. Quantitative conversion of the (6-4) photoproduct of TpdC to its Dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight. *Photochem Photobiol*. 51:161-7.
- Tentner, A.R., M.J. Lee, G.J. Ostheimer, L.D. Samson, D.A. Lauffenburger, and M.B. Yaffe. 2012. Combined experimental and computational analysis of DNA damage signaling reveals context-dependent roles for Erk in apoptosis and G1/S arrest after genotoxic stress. *Mol Syst Biol*. 8:568.
- Tercero, J.A., M.P. Longhese, and J.F. Diffley. 2003. A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell*. 11:1323-36.
- Thakur, M., M. Wernick, C. Collins, C.L. Limoli, E. Crowley, and J.E. Cleaver. 2001. DNA polymerase eta undergoes alternative splicing, protects against UV sensitivity and apoptosis, and suppresses Mre11-dependent recombination. *Genes Chromosomes Cancer*. 32:222-35.
- Therrien, J.P., R. Drouin, C. Baril, and E.A. Drobetsky. 1999. Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:15038-43.
- Thornton, T.M., and M. Rincon. 2009. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci*. 5:44-51.

- Tibbetts, R.S., K.M. Brumbaugh, J.M. Williams, J.N. Sarkaria, W.A. Cliby, S.Y. Shieh, Y. Taya, C. Prives, and R.T. Abraham. 1999. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 13:152-7.
- Tibbetts, R.S., D. Cortez, K.M. Brumbaugh, R. Scully, D. Livingston, S.J. Elledge, and R.T. Abraham. 2000. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev.* 14:2989-3002.
- Tomicic, M.T., P. Reischmann, B. Rasenberger, R. Meise, B. Kaina, and M. Christmann. 2011. Delayed c-Fos activation in human cells triggers XPF induction and an adaptive response to UVC-induced DNA damage and cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.* 68:1785-98.
- Tomida, J., A. Itaya, T. Shigechi, J. Unno, E. Uchida, M. Ikura, Y. Masuda, S. Matsuda, J. Adachi, M. Kobayashi, A.R. Meetei, Y. Maehara, K.I. Yamamoto, K. Kamiya, A. Matsuura, T. Matsuda, T. Ikura, M. Ishiai, and M. Takata. 2013. A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. *Nucleic Acids Res.* 41:6930-6941.
- Tong, L., S. Pav, D.M. White, S. Rogers, K.M. Crane, C.L. Cywin, M.L. Brown, and C.A. Pargellis. 1997. A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nat Struct Biol.* 4:311-6.
- Topisirovic, I., G.J. Gutierrez, M. Chen, E. Appella, K.L. Borden, and Z.A. Ronai. 2009. Control of p53 multimerization by Ubc13 is JNK-regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:12676-81.
- Tormanen, V.T., and G.P. Pfeifer. 1992. Mapping of UV photoproducts within ras proto-oncogenes in UV-irradiated cells: correlation with mutations in human skin cancer. *Oncogene.* 7:1729-36.
- Tournier, C., P. Hess, D.D. Yang, J. Xu, T.K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S.N. Jones, R.A. Flavell, and R.J. Davis. 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science.* 288:870-4.
- Trenz, K., A. Errico, and V. Costanzo. 2008. Plx1 is required for chromosomal DNA replication under stressful conditions. *Embo J.* 27:876-85.
- Unsal-Kacmaz, K., P.D. Chastain, P.P. Qu, P. Minoo, M. Cordeiro-Stone, A. Sancar, and W.K. Kaufmann. 2007. The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S

- checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol Cell Biol.* 27:3131-42.
- Unsal-Kacmaz, K., A.M. Makhov, J.D. Griffith, and A. Sancar. 2002. Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:6673-8.
- Ura, K., M. Araki, H. Saeki, C. Masutani, T. Ito, S. Iwai, T. Mizukoshi, Y. Kaneda, and F. Hanaoka. 2001. ATP-dependent chromatin remodeling facilitates nucleotide excision repair of UV-induced DNA lesions in synthetic dinucleosomes. *Embo J.* 20:2004-14.
- Ura, K., and J.J. Hayes. 2002. Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. *Eur J Biochem.* 269:2288-93.
- Ussar, S., and T. Voss. 2004. MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition. *J Biol Chem.* 279:43861-9.
- Van Den Blink, B., T. Ten Hove, G.R. Van Den Brink, M.P. Peppelenbosch, and S.J. Van Deventer. 2002. From extracellular to intracellular targets, inhibiting MAP kinases in treatment of Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 973:349-58.
- van Gent, D.C., J.H. Hoeijmakers, and R. Kanaar. 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet.* 2:196-206.
- Vare, D., P. Groth, R. Carlsson, F. Johansson, K. Erixon, and D. Jenssen. 2012. DNA interstrand crosslinks induce a potent replication block followed by formation and repair of double strand breaks in intact mammalian cells. *DNA Repair (Amst).* 11:976-85.
- Vaseva, A.V., and U.M. Moll. 2009. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1787:414-20.
- Vasquez, K.M. 2010. Targeting and processing of site-specific DNA interstrand crosslinks. *Environ Mol Mutagen.* 51:527-39.
- Ventura, J.J., A. Hubner, C. Zhang, R.A. Flavell, K.M. Shokat, and R.J. Davis. 2006. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell.* 21:701-10.
- Vetta, F., S. Ronzoni, M. Costarella, C. Donadio, L. Battista, G. Renzulli, G. Gentile, and S.M. Zuccaro. 2009. Recurrent syncope in elderly patients and tilt test table outcome: the role of comorbidities. *Arch Gerontol Geriatr.* 49 Suppl 1:231-6.

- Vilenchik, M.M., and A.G. Knudson. 2003. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:12871-6.
- Vilenchik, M.M., and A.G. Knudson, Jr. 2000. Inverse radiation dose-rate effects on somatic and germ-line mutations and DNA damage rates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:5381-6.
- Volker, M., M.J. Mone, P. Karmakar, A. van Hoffen, W. Schul, W. Vermeulen, J.H. Hoeijmakers, R. van Driel, A.A. van Zeeland, and L.H. Mullenders. 2001. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell*. 8:213-24.
- Vrouwe, M.G., A. Pines, R.M. Overmeer, K. Hanada, and L.H. Mullenders. 2011. UV-induced photolesions elicit ATR-kinase-dependent signaling in non-cycling cells through nucleotide excision repair-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci*. 124:435-46.
- Wade, M., E.T. Wong, M. Tang, J.M. Stommel, and G.M. Wahl. 2006. Hdmx modulates the outcome of p53 activation in human tumor cells. *J Biol Chem*. 281:33036-44.
- Waga, S., and B. Stillman. 1994. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature*. 369:207-12.
- Wagner, E.F., and A.R. Nebreda. 2009. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 9:537-49.
- Wakasugi, M., and A. Sancar. 1999. Order of assembly of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem*. 274:18759-68.
- Wan, Y.S., Z.Q. Wang, Y. Shao, J.J. Voorhees, and G.J. Fisher. 2001. Ultraviolet irradiation activates PI 3-kinase/AKT survival pathway via EGF receptors in human skin in vivo. *Int J Oncol*. 18:461-6.
- Wang, E., A. Lenferink, and M. O'Connor-McCourt. 2007. Cancer systems biology: exploring cancer-associated genes on cellular networks. *Cell Mol Life Sci*. 64:1752-62.
- Wang, E., J. Zou, N. Zaman, L.K. Beitel, M. Trifiro, and M. Paliouras. 2013a. Cancer systems biology in the genome sequencing era: Part 1, dissecting and modeling of tumor clones and their networks. *Semin Cancer Biol*. 23:279-85.

- Wang, E., J. Zou, N. Zaman, L.K. Beitel, M. Trifiro, and M. Paliouras. 2013b. Cancer systems biology in the genome sequencing era: Part 2, evolutionary dynamics of tumor clonal networks and drug resistance. *Semin Cancer Biol.* 23:286-92.
- Wang, H.Q., T. Quan, T. He, T.F. Franke, J.J. Voorhees, and G.J. Fisher. 2003a. Epidermal growth factor receptor-dependent, NF-kappaB-independent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway inhibits ultraviolet irradiation-induced caspases-3, -8, and -9 in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 278:45737-45.
- Wang, Q.E., C. Han, R. Zhao, G. Wani, Q. Zhu, L. Gong, A. Battu, I. Racoma, N. Sharma, and A.A. Wani. 2013c. p38 MAPK- and Akt-mediated p300 phosphorylation regulates its degradation to facilitate nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.* 41:1722-33.
- Wang, Q.E., Q. Zhu, M.A. Wani, G. Wani, J. Chen, and A.A. Wani. 2003b. Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 2:483-99.
- Wang, S.Y., and A.J. Varghese. 1967. Cytosine-thymine addition product from DNA irradiated with ultraviolet light. *Biochem Biophys Res Commun.* 29:543-9.
- Wang, X.Q., J.L. Redpath, S.T. Fan, and E.J. Stanbridge. 2006. ATR dependent activation of Chk2. *J Cell Physiol.* 208:613-9.
- Wang, X.W., H. Yeh, L. Schaeffer, R. Roy, V. Moncollin, J.M. Egly, Z. Wang, E.C. Freidberg, M.K. Evans, B.G. Taffe, and et al. 1995. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet.* 10:188-95.
- Wang, Y.C., V.M. Maher, D.L. Mitchell, and J.J. McCormick. 1993. Evidence from mutation spectra that the UV hypermutability of xeroderma pigmentosum variant cells reflects abnormal, error-prone replication on a template containing photoproducts. *Mol Cell Biol.* 13:4276-83.
- Wang, Y.Y., Z.Y. Ye, Z.S. Zhao, H.Q. Tao, and S.G. Li. 2010. Systems biology approach to identification of biomarkers for metastatic progression in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 136:135-41.
- Wang, Z., P.C. Harkins, R.J. Ulevitch, J. Han, M.H. Cobb, and E.J. Goldsmith. 1997. The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:2327-32.

- Wani, A.A., S.M. D'Ambrosio, and N.K. Alvi. 1987. Quantitation of pyrimidine dimers by immunoslot blot following sublethal UV-irradiation of human cells. *Photochem Photobiol.* 46:477-82.
- Ward, I.M., K. Minn, and J. Chen. 2004. UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress. *J Biol Chem.* 279:9677-80.
- Ward, J.F. 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 35:95-125.
- Watanabe, K., S. Tateishi, M. Kawasuji, T. Tsurimoto, H. Inoue, and M. Yamaizumi. 2004. Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *Embo J.* 23:3886-96.
- Waters, L.S., B.K. Minesinger, M.E. Wiltrout, S. D'Souza, R.V. Woodruff, and G.C. Walker. 2009. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73:134-54.
- Wei, F., Y. Xie, L. He, L. Tao, and D. Tang. 2011. ERK1 and ERK2 kinases activate hydroxyurea-induced S-phase checkpoint in MCF7 cells by mediating ATR activation. *Cell Signal.* 23:259-68.
- Whitmarsh, A.J., J. Cavanagh, C. Tournier, J. Yasuda, and R.J. Davis. 1998. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science.* 281:1671-4.
- Widmann, C., S. Gibson, M.B. Jarpe, and G.L. Johnson. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79:143-80.
- Wilson, K.P., M.J. Fitzgibbon, P.R. Caron, J.P. Griffith, W. Chen, P.G. McCaffrey, S.P. Chambers, and M.S. Su. 1996. Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 271:27696-700.
- Wittschieben, B.O., S. Iwai, and R.D. Wood. 2005. DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. *J Biol Chem.* 280:39982-9.
- Wood, R.D. 2011. Mammalian nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair. *Environ Mol Mutagen.* 51:520-6.

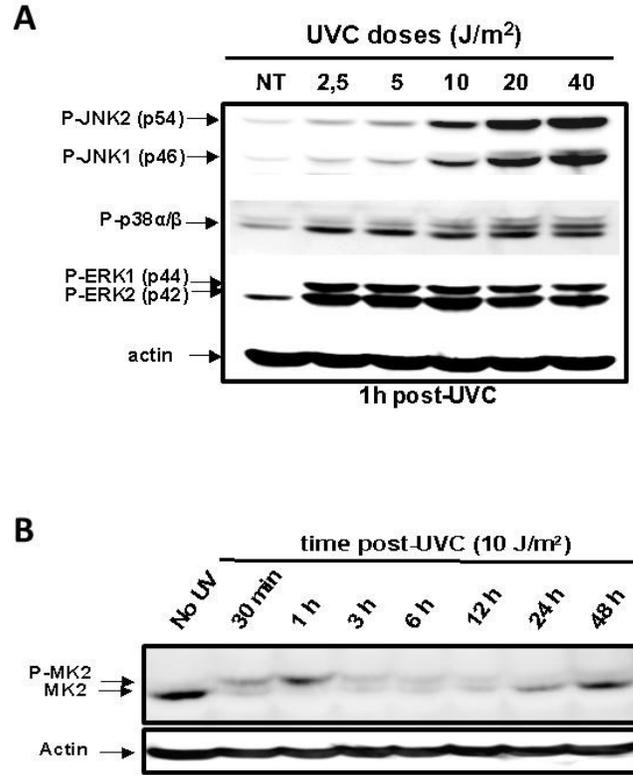
- Wood, R.D., M. Mitchell, and T. Lindahl. 2005. Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res.* 577:275-83.
- Wood, R.D., M. Mitchell, J. Sgouros, and T. Lindahl. 2001. Human DNA repair genes. *Science.* 291:1284-9.
- Wood, R.D., P. Robins, and T. Lindahl. 1988. Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts. *Cell.* 53:97-106.
- Wright, J.A., A.K. Chan, B.K. Choy, R.A. Hurta, G.A. McClarty, and A.Y. Tagger. 1990. Regulation and drug resistance mechanisms of mammalian ribonucleotide reductase, and the significance to DNA synthesis. *Biochem Cell Biol.* 68:1364-71.
- Wu, C.C., X. Wu, J. Han, and P. Sun. 2010. p38gamma regulates UV-induced checkpoint signaling and repair of UV-induced DNA damage. *Protein Cell.* 1:573-83.
- Wu, D., B. Chen, K. Parihar, L. He, C. Fan, J. Zhang, L. Liu, A. Gillis, A. Bruce, A. Kapoor, and D. Tang. 2006a. ERK activity facilitates activation of the S-phase DNA damage checkpoint by modulating ATR function. *Oncogene.* 25:1153-64.
- Wu, S., M. Tan, Y. Hu, J.L. Wang, D. Scheuner, and R.J. Kaufman. 2004. Ultraviolet light activates NFkappaB through translational inhibition of IkappaBalpha synthesis. *J Biol Chem.* 279:34898-902.
- Wu, X., S.M. Shell, Y. Liu, and Y. Zou. 2007. ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. *Oncogene.* 26:757-64.
- Wu, X., S.M. Shell, Z. Yang, and Y. Zou. 2006b. Phosphorylation of nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A by ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related-dependent checkpoint pathway promotes cell survival in response to UV irradiation. *Cancer Res.* 66:2997-3005.
- Xia, H.H., H. He, J. De Wang, Q. Gu, M.C. Lin, B. Zou, L.F. Yu, Y.W. Sun, A.O. Chan, H.F. Kung, and B.C. Wong. 2006. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a specific c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP-600125, in gastrointestinal cancers. *Cancer Lett.* 241:268-74.
- Xia, Y., C. Makris, B. Su, E. Li, J. Yang, G.R. Nemerow, and M. Karin. 2000. MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5243-8.

- Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R.J. Davis, and M.E. Greenberg. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 270:1326-31.
- Xu, Y. 2003. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ*. 10:400-3.
- Xu, Y., Y. Shao, J. Zhou, J.J. Voorhees, and G.J. Fisher. 2009. Ultraviolet irradiation-induces epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation in human keratinocytes. *J Cell Biochem*. 107:873-80.
- Yacoub, A., R. McKinstry, D. Hinman, T. Chung, P. Dent, and M.P. Hagan. 2003. Epidermal growth factor and ionizing radiation up-regulate the DNA repair genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 and LNCaP prostate carcinoma through MAPK signaling. *Radiat Res*. 159:439-52.
- Yacoub, A., J.S. Park, L. Qiao, P. Dent, and M.P. Hagan. 2001. MAPK dependence of DNA damage repair: ionizing radiation and the induction of expression of the DNA repair genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 human prostate carcinoma cells in a MEK1/2 dependent fashion. *Int J Radiat Biol*. 77:1067-78.
- Yajima, H., K.J. Lee, S. Zhang, J. Kobayashi, and B.P. Chen. 2009. DNA double-strand break formation upon UV-induced replication stress activates ATM and DNA-PKcs kinases. *J Mol Biol*. 385:800-10.
- Yalow, R.S., and S.A. Berson. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*. 184 (Suppl 21):1648-9.
- Yang, A., M. Kaghad, D. Caput, and F. McKeon. 2002. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet*. 18:90-5.
- Yang, A., M. Kaghad, Y. Wang, E. Gillett, M.D. Fleming, V. Dotsch, N.C. Andrews, D. Caput, and F. McKeon. 1998a. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. 2:305-16.
- Yang, S.H., A.J. Whitmarsh, R.J. Davis, and A.D. Sharrocks. 1998b. Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *Embo J*. 17:1740-9.
- Yang, Y., C.C. Li, and A.M. Weissman. 2004. Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene*. 23:2096-106.

- Yang, Z., R. Zhang, and L.A. Eriksson. 2011. A triplet mechanism for the formation of thymine-thymine (6-4) dimers in UV-irradiated DNA. *Phys Chem Chem Phys.* 13:8961-6.
- Yokoya, A., K. Fuji, N. Shikazono, K. Akamatsu, A. Urushibara, and R. Watanabe. 2008. Studies of soft X-ray-induced Auger effect on the induction of DNA damage. *Int J Radiat Biol.* 84:1069-81.
- Yoo, H.Y., A. Kumagai, A. Shevchenko, and W.G. Dunphy. 2004. Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell.* 117:575-88.
- Yoon, J.H., C.S. Lee, T.R. O'Connor, A. Yasui, and G.P. Pfeifer. 2000. The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *J Mol Biol.* 299:681-93.
- Yoon, S., and R. Seger. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 24:21-44.
- Yu, C., Y. Minemoto, J. Zhang, J. Liu, F. Tang, T.N. Bui, J. Xiang, and A. Lin. 2004. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell.* 13:329-40.
- Yu, S.L., R.E. Johnson, S. Prakash, and L. Prakash. 2001. Requirement of DNA polymerase eta for error-free bypass of UV-induced CC and TC photoproducts. *Mol Cell Biol.* 21:185-8.
- Yuasa, M., C. Masutani, T. Eki, and F. Hanaoka. 2000. Genomic structure, chromosomal localization and identification of mutations in the xeroderma pigmentosum variant (XPV) gene. *Oncogene.* 19:4721-8.
- Yun, M.H., and K. Hiom. 2009. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature.* 459:460-3.
- Zabel, U., R. Schreck, and P.A. Baeuerle. 1991. DNA binding of purified transcription factor NF-kappa B. Affinity, specificity, Zn<sup>2+</sup> dependence, and differential half-site recognition. *J Biol Chem.* 266:252-60.
- Zhang, R.B., and L.A. Eriksson. 2006. A triplet mechanism for the formation of cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA. *J Phys Chem B.* 110:7556-62.
- Zhang, Y., W.Y. Ma, A. Kaji, A.M. Bode, and Z. Dong. 2002. Requirement of ATM in UVA-induced signaling and apoptosis. *J Biol Chem.* 277:3124-31.

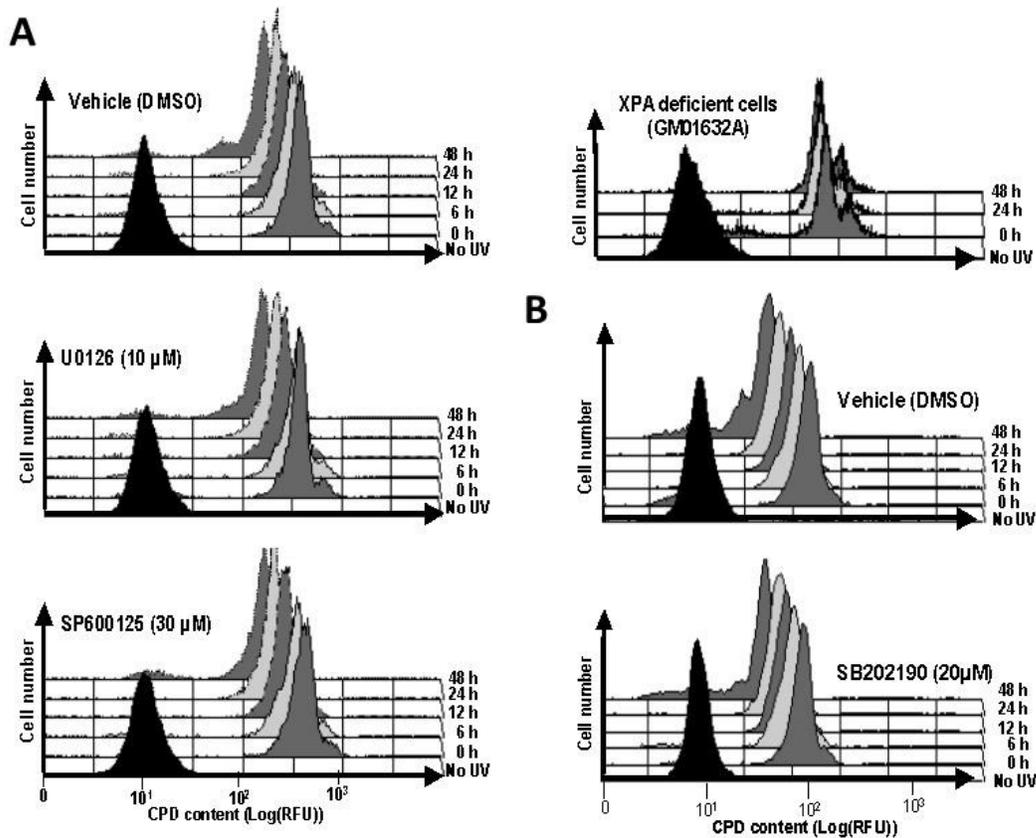
- Zhao, Q., B.M. Barakat, S. Qin, A. Ray, M.A. El-Mahdy, G. Wani, S. Arafa el, S.N. Mir, Q.E. Wang, and A.A. Wani. 2008. The p38 mitogen-activated protein kinase augments nucleotide excision repair by mediating DDB2 degradation and chromatin relaxation. *J Biol Chem.* 283:32553-61.
- Zhao, Q., Q.E. Wang, A. Ray, G. Wani, C. Han, K. Milum, and A.A. Wani. 2009. Modulation of nucleotide excision repair by mammalian SWI/SNF chromatin-remodeling complex. *J Biol Chem.* 284:30424-32.
- Zheng, C., Z. Lin, Z.J. Zhao, Y. Yang, H. Niu, and X. Shen. 2006. MAPK-activated protein kinase-2 (MK2)-mediated formation and phosphorylation-regulated dissociation of the signal complex consisting of p38, MK2, Akt, and Hsp27. *J Biol Chem.* 281:37215-26.
- Zhou, B.B., and S.J. Elledge. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 408:433-9.
- Zhu, Q., G. Wani, N. Sharma, and A. Wani. 2012. Lack of CAK complex accumulation at DNA damage sites in XP-B and XP-B/CS fibroblasts reveals differential regulation of CAK anchoring to core TFIIH by XPB and XPD helicases during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 11:942-50.
- Ziv, O., N. Geacintov, S. Nakajima, A. Yasui, and Z. Livneh. 2009. DNA polymerase zeta cooperates with polymerases kappa and iota in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:11552-7.

# **ANNEXES**



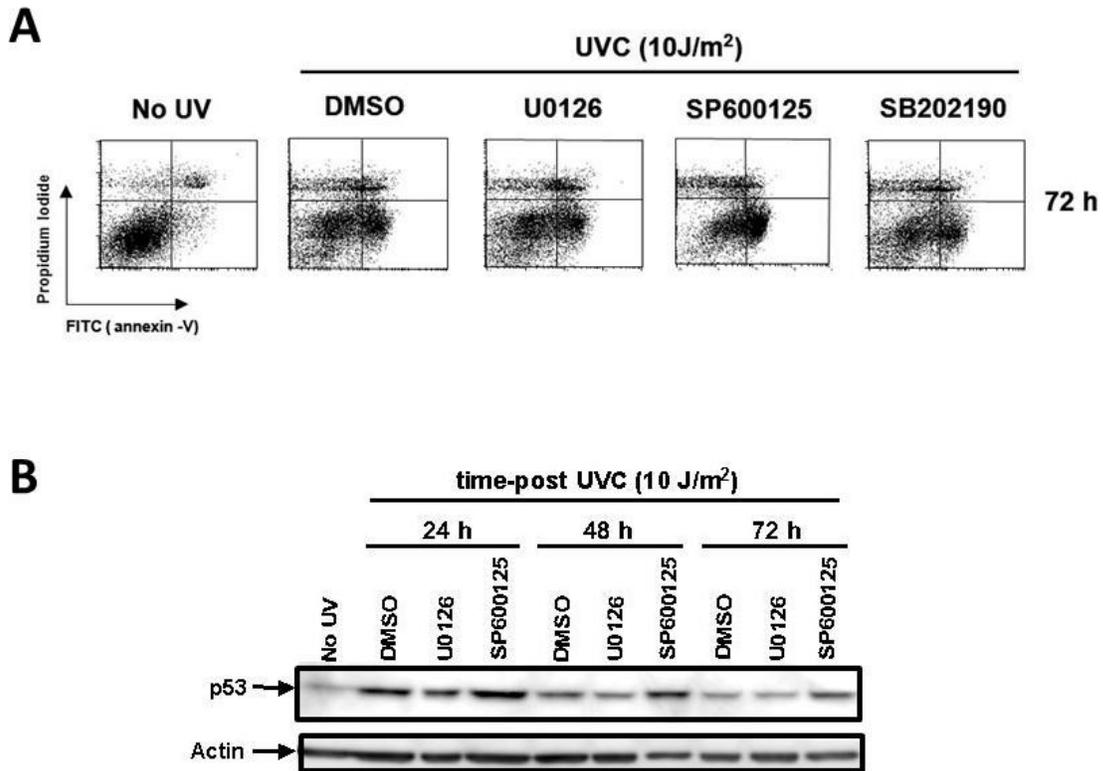
**Figure Supp.I.1:** Activation des voies MAPK et de la kinase MK2, induite par les UV dans les cellules GM01652B.

A. Activation des voies MAPK dans les cellules GM01652B après une exposition à différentes doses UVC (de 2.5 à  $40 J/m^2$ ). NT, indique les cellules non-exposées aux UV. B. Activation de la kinase MK2 après une exposition à  $10 J/m^2$  de 30 min à 48 h post UV. No UV, indique les cellules non exposées aux UV.



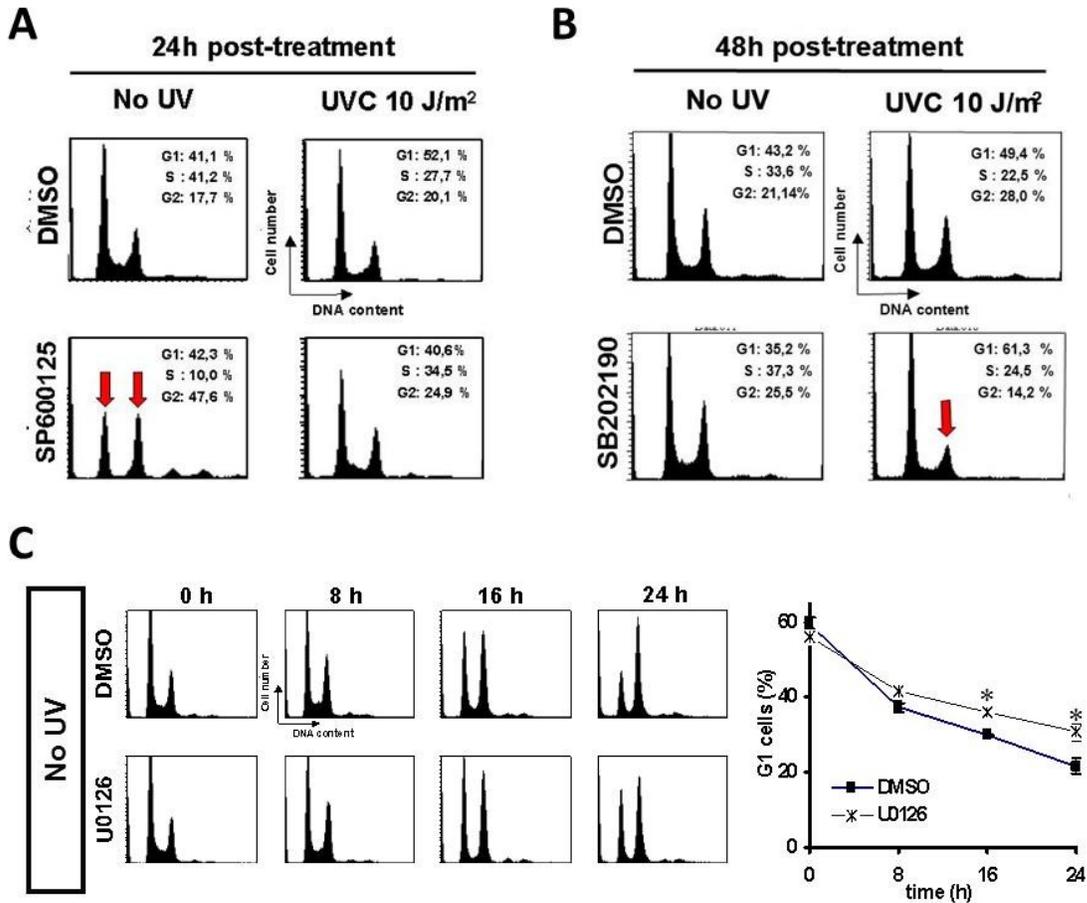
**Figure Supp.I.2:** Résultats bruts représentatifs de la cinétique de réparation GGNER des CPD dans les fibroblastes primaires humains normaux GM01652B, en absence ou en présence d'inhibiteur MAPK après une exposition à  $10\text{J/m}^2$  grâce à la méthode de réparation GGNER basée sur la cytométrie en flux.

A. Résultats bruts représentatifs de la cinétique de réparation GGNER des CPD des cellules GM01652B en absence (DMSO) ou en présence d'inhibiteurs MAPK (SP600125 ou U0126) et dans les fibroblastes primaires de patient XP-A (GM01630), utilisées ici comme contrôles négatifs de réparation. La réparation est examinée de 0 h à 48 h post-UV. Chaque pic représente la distribution de l'intensité FITC au temps post-UV indiqués à droite. B. Résultats bruts représentatifs de la réparation des CPD dans les cellules GM0652B traitées ou non avec l'inhibiteur SB202190. DMSO, Me<sub>2</sub>SO et indique les cellules non traitées aux inhibiteurs MAPK.



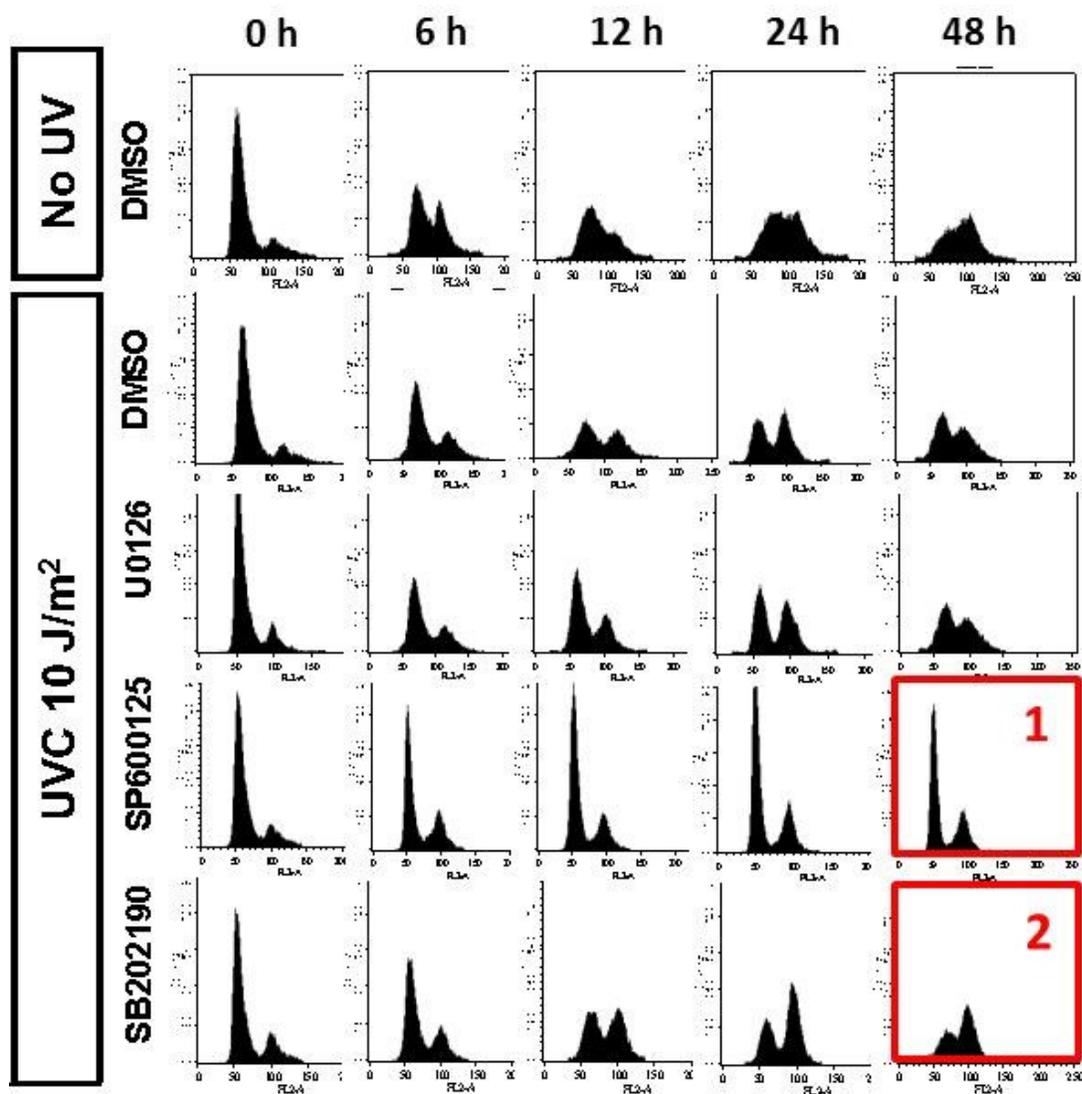
**Figure Supp.I.3:** Analyse de l'apoptose induite par les UV dans les cellules HDLF après un traitement aux inhibiteurs MAPK.

**A.** Résultats brutes représentatifs de l'analyse de l'apoptose induite par les UV à 72 h par marquage Annexin-V des cellules HDLF. Distribution à 2 variables dans les cellules HDLF vivantes et marquées en surface avec l'anticorps Annexin-V. Le cadran en bas à droite montre les cellules Annexin-V positives (en apoptose précoce) et le cadran en haut à droite représente la population de cellules nécrotiques. **B.** Détection de p53 dans les HDLF traitées ou non avec les inhibiteurs MAPK après une exposition UV de 10J/m<sup>2</sup> aux temps post-UV indiqués. Le niveau de p53 induit par les UV est augmenté dans les cellules traitées avec l'inhibiteur JNK1/2 SP600125, et non avec les inhibiteurs des autres voies MAPK.DMSO. DMSO, (Me<sub>2</sub>SO) indique les cellules non traitées aux inhibiteurs MAPK.



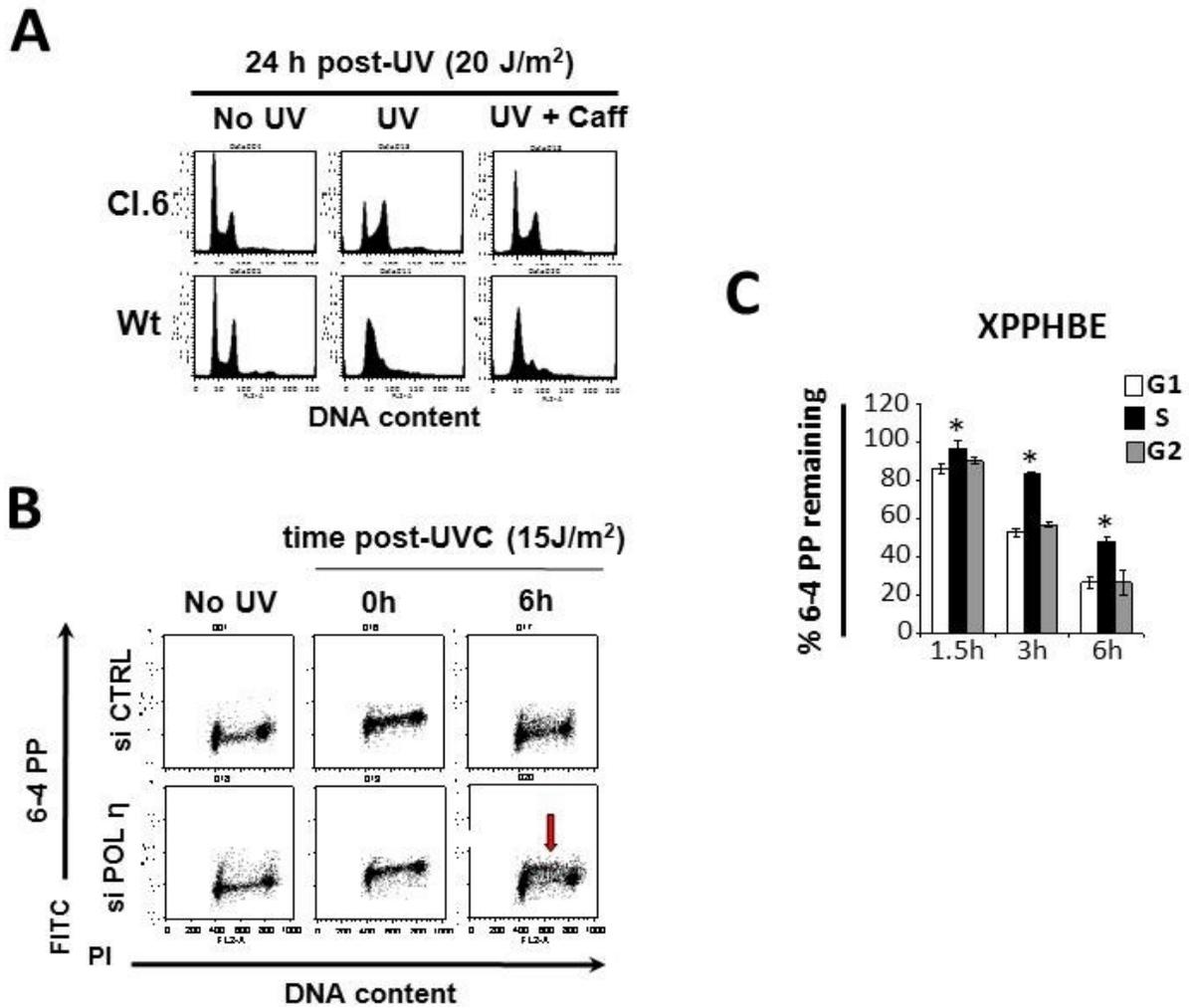
**Figure Supp.I.4: Les voies MAPK sont des régulateurs critiques de la progression cellulaire des cellules HDLF exposées ou non aux UV: effet des inhibiteurs pharmacologiques MAPK.**

**A.** Analyse du cycle cellulaire des cellules HDLF asynchrones, traitées ou non, avec l'inhibiteur MAPK SP600125, exposées ou non aux UV. Les pourcentages indiquent la proportion des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire comme indiqué. La distribution des populations HDLF dans les phases du cycle cellulaire et représentée par le contenu ADN avec le pic G1 (2N), phase S et le pic G2 (4N) obtenus par analyse en cytométrie en flux par marquage au propidium iodide (PI, DNA content). **B.** Analyse du cycle cellulaire des cellules HDLF asynchrones, traitées ou non, avec l'inhibiteur MAPK SB202190 et exposées ou non aux UV. Les pourcentages indiquent la proportion des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire comme indiqué. **C.** Analyse de cycle cellulaire des cellules HDLF, synchronisées en G2/M (grâce à l'ajout du nocadazole), traitées ou non avec l'inhibiteur MAPK U0126 et non-exposées aux UV. Un léger ralentissement significatif de la progression cellulaire est visible à 16 h et 24 h dans les cellules non exposées. Le graphique indique la quantification de la proportion cellulaire en phase G1, exprimée en pourcentage après le traitement avec l'inhibiteur U0126. \* $p < 0,05$ , différence significative entre la phase G1 des cellules traitées U0126 relatives aux cellules non traitées (test t-student bilatéral). DMSO, Me<sub>2</sub>SO et indique les cellules non traitées aux inhibiteurs MAPK. No UV, indique l'absence d'une exposition aux UV.



**Figure Supp.I.5:** Analyse de la progression cellulaire des cellules HDSF traitées au nocodazole en présence ou en absence des inhibiteurs pharmacologiques des voies MAPK après une exposition UV de 10 J/m<sup>2</sup>.

Profils de la distribution des cellules en fonction des différentes phases du cycle cellulaire des fibroblastes normaux HDSF (GM01652B) traités aux inhibiteurs MAPK après une exposition aux UV, analysés de 0 h à 48 h post-UV. Les profils de distribution cellulaires sont obtenus par marquage avec le iodure de propidium (PI) puis analysés par cytométrie en flux. Le carré rouge 1 représente un défaut de la progression cellulaire et semble indiquer une absence de progression cellulaire en présence de l'inhibiteur SP600125. En revanche, le carré rouge 2 représente une accélération de la progression cellulaire, relativement à l'absence d'inhibiteurs MAPK (DMSO), ce qui indique probablement une abrogation de point de contrôle du cycle cellulaire induite par le traitement SB202190. DMSO, (Me<sub>2</sub>SO) et indique les cellules non traitées aux inhibiteurs MAPK.



**Figure Supp.II.1:** Etude de l'effet de la déficience Pol  $\eta$  sur la réparation GGNER dans les cellules normales net XP-V.

A. Distribution cellulaire dans chaque phase du cycle des cellules XP30ROsv et XP30ROsv-Pol  $\eta$ /cl6 en absence et en présence de caféine après une exposition aux UV. Dans les cellules XP30ROsv, un ralentissement drastique de la prolifération est observable, ainsi qu'une accumulation à la transition G1/S uniquement. Ce type de profil post-UV dans les cellules XP30ROsv est une caractéristique du syndrome XP-V. B. Résultats bruts représentatifs de l'effet de l'inhibition de l'expression de Pol  $\eta$  sur la réparation GGNER des 6-4PP dans les cellules primaires HDLF. La flèche rouge indique le défaut de réparation visible en phase S. C. Représentation graphique de la cinétique de réparation GGNER des 6-4PP dans les cellules XPPHBE de patient XP-V suite à une exposition de 15 J/m<sup>2</sup>. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et sont exprimés en pourcentage relatifs au temps t=0 \*p<0.05, indique une différence significative entre la phase S relative à la phase la phase G1.

# ARTICLE 1

## A Sensitive Flow Cytometry-based Nucleotide Excision Repair Assay Unexpectedly Reveals That Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Does Not Regulate the Removal of UV-induced DNA Damage in Human Cells\*

Received for publication, July 30, 2007, and in revised form, December 17, 2007. Published, JBC Papers in Press, December 18, 2007, DOI 10.1074/jbc.M706257200

Raphael Rouget<sup>1</sup>, Yannick Auclair<sup>1</sup>, Martin Loignon, El Bachir Affar, and Elliot A. Drobetsky<sup>2</sup>

From the Department of Immunology/Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

In response to diverse genotoxic stimuli (e.g. UV and cisplatin), the mitogen-activated protein kinases ERK1/2, JNK1/2, and p38 $\alpha$ / $\beta$  become rapidly phosphorylated and in turn activate multiple downstream effectors that modulate apoptosis and/or growth arrest. Furthermore, previous lines of evidence have strongly suggested that ERK1/2 and JNK1/2 participate in global-genomic nucleotide excision repair, a critical antineoplastic pathway that removes helix-distorting DNA adducts induced by a variety of mutagenic agents, including UV. To rigorously evaluate the potential role of mitogen-activated protein kinases in global-genomic nucleotide excision repair, various human cell strains (primary skin fibroblasts, primary lung fibroblasts, and HCT116 colon carcinoma cells) were treated with highly specific chemical inhibitors, which, following UV exposure, (i) abrogated the capacities of ERK1/2, JNK1/2, or p38 $\alpha$ / $\beta$  to phosphorylate specific downstream effectors and (ii) characteristically modulated cellular proliferation, clonogenic survival, and/or apoptosis. A highly sensitive flow cytometry-based nucleotide excision repair assay recently optimized and validated in our laboratory was then employed to directly demonstrate that the kinetics of UV DNA photoadduct repair are highly similar in mock-treated *versus* mitogen-activated protein kinase inhibitor-treated cells. These data on primary and tumor cells treated with pharmacological inhibitors were fully corroborated by repair studies using (i) short hairpin RNA-mediated knockdown of ERK1/2 or JNK1/2 in human U2OS osteosarcoma cells and (ii) expression of a dominant negative p38 $\alpha$  mutant in human primary lung fibroblasts. Our results provide solid evidence for the first time, in disaccord with a burgeoning perception, that mitogen-activated protein kinase signaling does not influence the efficiency of human global-genomic nucleotide excision repair.

Nucleotide excision repair (NER)<sup>3</sup> is the only pathway available to human cells for the removal of helix-distorting (replication- and transcription-blocking) "bulky" DNA adducts generated by a multitude of environmental carcinogens. Among these adducts is the highly promutagenic UV-induced cyclobutane pyrimidine dimer (CPD), which lies at the origin of sunlight-associated mutagenesis and skin cancer development (1). The physiological importance of NER is highlighted by xeroderma pigmentosum (XP), a rare genetic disorder characterized by defective removal of bulky DNA adducts, UV hypersensitivity, and striking predisposition to skin cancer (2). Furthermore, NER status of tumors in cancer patients has been identified as a major determinant in the clinical response to UV-mimetic chemotherapeutic agents, such as cisplatin, which exert antineoplastic effects via the induction of bulky DNA adducts (3).

NER is composed of two distinct subpathways (*i.e.* global genomic-NER (GG-NER) removes bulky adducts from the genome overall, whereas transcription-coupled NER (TC-NER) removes such adducts exclusively from the transcribed strands of active genes) (see Ref. 4 for an excellent overview). These subpathways differ only in the mechanism of lesion recognition. GG-NER is triggered when the UV-DDB1/UV-DDB2 heterodimer recognizes and binds the helical distortion created by bulky adducts, which is followed by recruitment of the XPC-hHR23B complex. On the other hand, TC-NER is initiated uniquely by blockage of RNA polymerase II and subsequent recruitment of the CS-A and CS-B gene products. Thereafter, in the case of either GG-NER or TC-NER, the common "core NER pathway" is recruited to faithfully restore the integrity of the DNA through sequential steps of localized strand unwinding, incision of the DNA on either side of the adduct, excision of the adduct leaving a small single-stranded gap, and, finally, gap filling and ligation using normal DNA replication factors and the intact complementary strand as template.

\* This study was supported by the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society and by the Canadian Institutes for Health Research. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: NER, nucleotide excision repair; CPD, cyclobutane pyrimidine dimer; XP, xeroderma pigmentosum; GG-NER, global genomic-NER; TC-NER, transcription-coupled NER; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; HDSF, human diploid skin fibroblast; HDLF, human diploid lung fibroblast; PBS, phosphate-buffered saline; shRNA, short hairpin RNA; GST, glutathione S-transferase; XPC, XP complementation group C; XPA, XP complementation group A; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PP, photoproduct.

## The Role of MAPKs in UV Damage/Repair

Since its initial discovery over 40 years ago, the GG-NER pathway has been extensively studied and fully reconstituted *in vitro* (5). Nonetheless, relatively little is known about the potential roles in this repair process of various preeminent mutagen-responsive cellular signaling cascades. It has, however, been shown in many human cell lines treated with the model mutagen 254-nm UV (hereafter UV) that the p53 tumor suppressor, a critical stress-induced regulator of apoptosis and cell cycle checkpoints, is strictly required for efficient GG-NER (6, 7). In support of this, up-regulation of the GG-NER-specific proteins UV-DDB2 and XPC were shown to depend upon the presence of functional p53 (8, 9). Furthermore, p53 up-regulates Gadd45 and binds the histone acetyltransferase p300, events required to stimulate chromatin relaxation, which in turn facilitates access of GG-NER recognition proteins to damaged heterochromatin within the genome overall (10, 11).

Following exposure to diverse genotoxic agents, the canonical mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including extracellular signal-related kinase (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK1/2), and p38 $\alpha$ / $\beta$  kinase, become rapidly phosphorylated and go on to activate a plethora of transcription factors that regulate apoptosis and/or growth arrest (12). Of particular interest here, it has been demonstrated in UV-irradiated human cells that all three MAPKs phosphorylate p53 on multiple amino acid residues and that this has functional consequences for both p53 stabilization and p53-dependent apoptosis (13–17). This substantial level of cross-talk between the MAPK and p53 pathways strongly suggests *a priori* that the former pathway may also play a role in p53-dependent GG-NER. Although previous investigations have supported such a role in human cells, this important issue has still not been conclusively addressed (see “Discussion”). We thus employed human primary and tumor cell strains wherein MAPK signaling was abrogated using highly specific small molecule inhibitors, shRNA targeting, and/or expression of dominant negative mutant protein. A sensitive flow cytometry-based NER assay recently optimized and validated in our laboratory was then used to directly determine, in each UV-irradiated human strain, whether or not individual MAPKs modulate the efficiency of DNA photoproduct removal via GG-NER.

### MATERIALS AND METHODS

**Cell Culture**—Primary human diploid skin fibroblasts (HDSFs), including the wild type strain (GM01652B) and XPA-deficient counterpart (GM01630), were purchased from the Coriell Institute. Primary human diploid lung fibroblasts (HDLFs) were provided by Dr. J. Sedivy (Brown University). HDLF-E6 (*i.e.* a p53-deficient isogenic derivative stably expressing the HPV-E6 oncoprotein) was described previously (18). Low passage HDSFs and HDLFs were cultured in Eagle's minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum, L-glutamine, and antibiotics (Wisent, Montreal, Canada). HCT116/p53<sup>+/+</sup> human colon carcinoma cells and the isogenic p53-deficient counterpart (HCT116/p53<sup>-/-</sup>) (a gift of Dr. B. Vogelstein, The Johns Hopkins University) were cultured in McCoy's 5A supplemented with 10% fetal bovine serum, L-glutamine, and antibiotics. Human U2OS osteosarcoma cells

were grown in Dulbecco's minimal essential medium containing 10% fetal bovine serum, L-glutamine, and antibiotics.

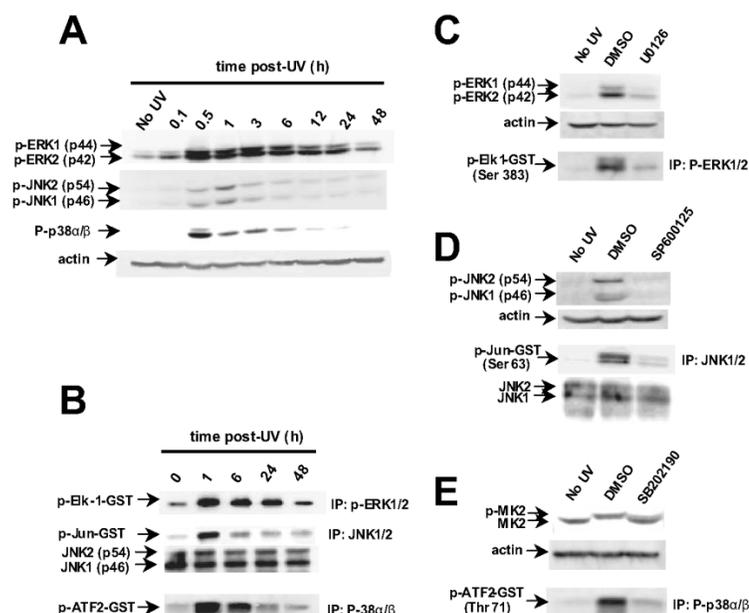
**UV Irradiation**—Cell monolayers were washed twice with PBS, covered with 2 ml of PBS, and irradiated with UV using a Philips G25T8 germicidal lamp at a fluence of 0.2 J/m<sup>2</sup>/s.

**Pharmacological Inhibition of MAPK Activity in Human Primary and Tumor Cell Strains**—HDSFs, HDLFs, or HCT116 colon carcinoma cells were pretreated for 2 h with Me<sub>2</sub>SO (carrier) or with one among the highly specific chemical MAPK inhibitors 10  $\mu$ M U0126, 30  $\mu$ M SP600125, or 20  $\mu$ M SB202190 (Cell Signaling Technology, Inc.) to abrogate signaling through ERK1/2, JNK1/2, and p38 $\alpha$ / $\beta$ , respectively. Following UV or mock irradiation, fresh medium containing either Me<sub>2</sub>SO or inhibitor was added during subsequent incubations.

**shRNA-mediated Knockdown of ERK1/2, JNK1/2, or p53 in U2OS Osteosarcoma Cells**—shRNA constructs, cloned into the pLKO.1-puro vector and targeting ERK1 (clone TRCN0000006150), ERK2 (clone TRCN0000010050), JNK1 (clone TRCN0000010580), or JNK2 (clone TRCN000001012), were purchased from Sigma. ERK1 and ERK2 or JNK1 and JNK2 shRNA constructs were pooled (4  $\mu$ g of each) and transiently transfected into U2OS osteosarcoma cells using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's directions (Invitrogen). Immediately following antibiotic selection (*i.e.* for 3 days in 2  $\mu$ g/ml puromycin), transfected cells were incubated for 3–5 h in complete medium without antibiotic prior to treatment with UV. Cells transfected with pLKO.1 expressing a scrambled shRNA were used as control.

For stable knockdown of p53 protein in U2OS cells, an shRNA targeting nucleotides 1095–1115 of this tumor suppressor was chosen (GenBank<sup>TM</sup> accession number AF307851). This shRNA was cloned into the pSuper-retroviral vector (Oligo-Engine), and infectious retroviral particles were produced following transfection of PT67 packaging cells. Retroviral transductions were carried out as previously described (19). A polyclonal U2OS population stably expressing p53-targeting shRNA was obtained following selection in 2  $\mu$ g/ml puromycin (Sigma). The efficiencies of ERK1/2, JNK1/2, and p53 knockdowns were monitored by Western blotting (see below).

**Abrogation of p38 $\alpha$ / $\beta$  Signaling in HDLFs via Stable Expression of the Dominant Negative Mutant p38 $\alpha$  (AGF)**—Total RNA from HDLFs was reverse transcribed using oligo(dT) primers (Invitrogen). Four  $\mu$ l of the reaction was used for PCR amplification of full-length human p38 $\alpha$  wild type cDNA (GenBank<sup>TM</sup> accession number NM\_001315.1) using cloned *pfu* polymerase (Stratagene) in conjunction with the forward and reverse primers (5'-GCTGGAAAATGTCTCAGGAGA-3' and 5'-CTCAGGACTCCATCTCTTCTT-3'), respectively. The wild type p38 $\alpha$  cDNA was cloned into the retroviral vector pMSCVretro (Clontech). The dominant negative p38 $\alpha$  (AGF) mutant (20) was then produced using site-directed mutagenesis according to the manufacturer's protocol (QuikChange site-directed mutagenesis kit; Stratagene). Point mutations were introduced at each of the p38 $\alpha$  kinase activation sites ((Thr<sup>180</sup> (ACA)  $\rightarrow$  Ala<sup>180</sup> (GCA) and Tyr<sup>182</sup> (TAC)  $\rightarrow$  Phe<sup>182</sup> (TTC)) using the following forward/reverse primer sets (mutations underlined): 5'-C ACA GAT GAT GAA ATG GCA GGC TAC GTG GCC-3' and 5'-GGC CAC GTA GCC TGC CAT TTCATC



**FIGURE 1. Activation and pharmacological abrogation of MAPK signaling in UV-exposed primary human skin fibroblasts.** A, normal HDSFs were harvested at the indicated times post-UV and analyzed by Western blotting for specific phosphorylated MAPKs using primary antibodies directed against the threonine/tyrosine activation sites of ERK1/2, JNK1/2, and p38 $\alpha$ / $\beta$ . B, the ability of phosphorylated ERK1/2, JNK1/2, and p38 $\alpha$ / $\beta$  to activate the specific downstream effectors GST-Elk-1, GST-Jun, or GST-ATF2, respectively, was assessed at the indicated times post-UV using solid-phase kinase assays (see "Materials and Methods") in conjunction with Western analysis. C–E, to evaluate pharmacological inhibition of MAPK activity, HDSFs were isolated (i) with no treatment (No UV) or (ii) at 1 h post-UV in the presence of either carrier (Me<sub>2</sub>SO; DMSO) or of a specific MAPK inhibitor, as indicated. Detection of phospho-ERK1/2 and -Elk-1 (C), phospho-JNK1/2 and -c-Jun (D), and phospho-MK2 and -ATF-2 (E) were accomplished as described under "Materials and Methods." For A–E, actin was used as protein loading control with the following exceptions. (i) For detection of GST-phospho-c-Jun, total JNK1/2 was first immunoprecipitated (IP) and then probed with anti-phospho-c-Jun antibody. In this case, total JNK1/2 can be, and was, used as loading control. (ii) For detection of phospho-Elk-1 or phospho-ATF2, no loading control was possible, since these effectors were directly immunoprecipitated in the phosphorylated forms.

ATC TGT G-3'; 5'-GAT GAA ATG GCA GGC TTC GTG GCC ACT AGG TGG-3' and 5'-CCA CCT AGT GGC CAC GAA GCC TGC CAT TTC ATC-3'). A polyclonal HDLF population stably expressing p38 $\alpha$  (AGF) was isolated by retroviral transduction as mentioned above. Inhibition of p38 $\alpha$ / $\beta$  signaling was monitored by Western blotting (see below).

**Activation and Inhibition of MAPK Signaling Determined by Western Blotting**—Western blotting was performed in human primary and tumor cell strains as previously described (19). Activation or pharmacological inhibition of MAPK signaling was evaluated (i) by measuring levels of phosphorylated MAPKs using anti-phospho-ERK1/2, -JNK1/2, or -p38 $\alpha$ / $\beta$  antibodies (BIOSOURCE International) and/or (ii) by measuring levels of phosphorylated downstream MAPK effectors, where solid-phase kinase assay kits (Cell Signaling Technology, Inc.) were first used to pull down phospho-ERK1/2, total JNK1/2, or phospho-p38 $\alpha$ / $\beta$ . This was followed by phosphorylation reactions *in vitro* and detection of activated substrates (*i.e.* phospho-Elk-1, -c-Jun, or -ATF-2) using specific anti-phosphoantibodies. In order to assess p38 $\alpha$ / $\beta$  activity *in vivo*, as described and validated previously (21, 22), levels of phosphorylated forms of the specific p38 $\alpha$ / $\beta$  substrate MAPKAPK2

## The Role of MAPKs in UV Damage/Repair

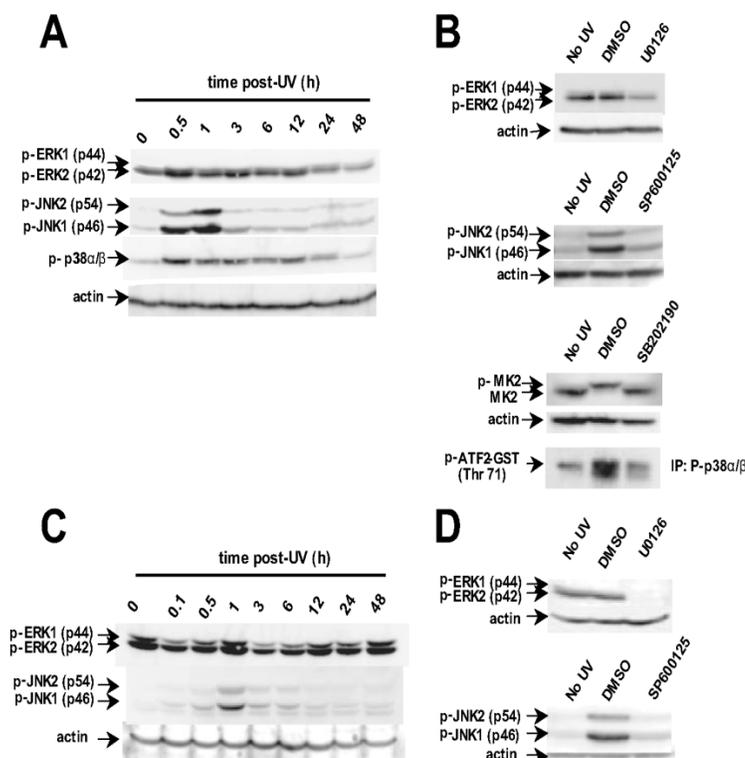
(hereafter MK2) were distinguished from and compared with unphosphorylated forms by band shift using an anti-MK2 antibody (Cell Signaling Technology Inc.). In order to verify shRNA knockdowns, levels of total ERK1/2, total JNK1/2, or p53 were probed using anti-ERK1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-SAPK/JNK (Cell Signaling Technology, Inc.), or anti-p53 (Santa Cruz) antibodies, respectively. To evaluate inhibition of p38 $\alpha$ / $\beta$  signaling by expression of dominant negative p38 $\alpha$  (AGF), MK2 phosphorylation was quantified as described above. Actin, or in some cases total JNK, was used as loading control. Bands were quantified by densitometry using Multi-gauge software (Fuji Corp.).

**Flow Cytometry-based Determination of GG-NER Kinetics**—Normal or XPA-deficient HDSFs were maintained at confluence for 4 days prior to irradiation (yielding > 95% synchronization in G<sub>0</sub>) and maintained at confluence during post-UV incubation. In the case of HDLFs or colon carcinoma cells, exponentially growing monolayers were synchronized in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> by serum starvation (0.5%) for 3 days, and 3 h before treatment fresh complete medium was added to restimulate proliferation. U2OS cells tran-

siently expressing shRNAs could not be synchronized by either confluence or serum starvation. As such, immediately following UV exposure, 200 ng/ml nocodazole was added to the medium to block cell division.

At various times post-UV, cells were washed with PBS plus 50 mM EDTA, trypsinized, resuspended in 1 ml of PBS plus 50 mM EDTA, and fixed by the addition of 3 ml of ice-cold 100% ethanol.  $1 \times 10^6$  fixed cells were then washed with PBS plus 50 mM EDTA, resuspended in either 0.5% Triton X-100 plus 2 N HCl (for CPD detection) or 0.5% Triton X-100 plus 0.1 N HCl (for 6-4 photoproduct (6-4PP) detection), and incubated for 20 min at 22 °C. Cells were washed with 0.1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (pH 9.0) and then with PBS and resuspended in 300  $\mu$ l of RNase (100  $\mu$ g/ml in PBS) for 1 h at 37 °C followed by washing with PBS-TB (1% bovine serum albumin plus 0.25% Tween 20 in PBS). Cells were resuspended in PBS-TB containing a primary monoclonal antibody against either CPDs or 6-4PPs (Kamiya Biomedical Company) for 1 h at room temperature, washed with PBS-TB, and then resuspended in 300  $\mu$ l of fluorescein isothiocyanate-conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody for 45 min at room temperature. Pellets were washed twice with PBS-TB and resuspended in 300  $\mu$ l of PBS containing 5  $\mu$ g/ml propidium

## The Role of MAPKs in UV Damage/Repair



**FIGURE 2. Activation and pharmacological abrogation of MAPK signaling in UV-exposed primary human lung fibroblasts and HCT116p53<sup>+/+</sup> colon carcinoma cells.** Phosphorylation and pharmacological inhibition of specific MAPKs in exponentially growing HDLFs (A and B) or in human HCT116p53<sup>+/+</sup> (C and D) were evaluated essentially as described in the legend to Fig. 1 for HDLFs. DMSO, Me<sub>2</sub>SO; IP, immunoprecipitation.

iodide (Molecular Probes, Inc.), and repair kinetics were monitored for populations gated in G<sub>1</sub> using a flow cytometer fitted with an argon laser and CellQuestPro software (BD Biosciences).

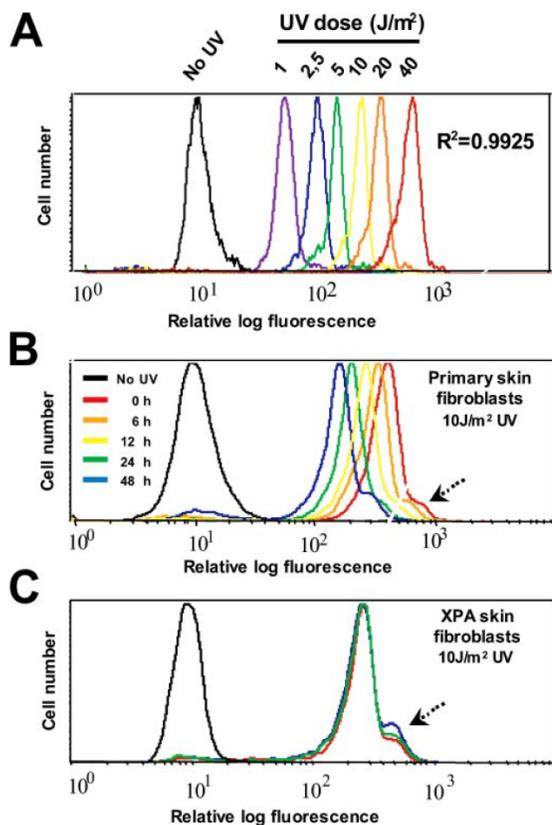
**Evaluation of Apoptosis, Clonogenic Survival, and Cellular Proliferation in HDLFs**—At various times post-UV, in HDLFs treated or not treated with MAPK inhibitors, apoptosis was investigated by both (i) annexin-V labeling using a kit according to the manufacturer's directions (Sigma) and (ii) sub-G<sub>1</sub> peak analysis following staining of cells with propidium iodide. Annexin-V-positive early apoptotic cells or propidium iodide-positive sub-G<sub>1</sub> cells were quantified using a FACScan flow cytometer fitted with CellQuestPro software (BD Biosciences). For determination of clonogenic survival, appropriate cell numbers were seeded on 100-mm dishes 6 h prior to treatments with or without MAPK inhibitors. Cells were incubated for 15–21 days, and colonies were scored after staining with 0.5% methylene blue in 50% methanol. Cellular proliferation was evaluated by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay using a kit as described by the manufacturer (American Type Culture Collection).

resulted in strong diminishment (>85%) of ERK1/2, JNK1/2, or p38α/β activity at 1 h post-UV (Fig. 1, C–E). Results similar to those described immediately above for MAPK activation/abrogation in HDLFs were obtained for UV-irradiated HDLFs (Fig. 2, A and B). However in the case of HCT116/p53<sup>+/+</sup>, although phospho-JNK1/2 peaked at 1 h post-UV as anticipated, ERK1/2 appeared to be constitutively phosphorylated (Fig. 2, C and D), and no phospho-p38α/β could be detected within 48 h despite the presence of nonphosphorylated forms (not shown).

**Optimization and Validation of a Flow Cytometry-based DNA Repair Assay and Its Application to Examine the Potential Role of MAPK Signaling in Human GG-NER**—In parallel with the above MAPK activation/abrogation studies, cultures were set aside at various times post-UV to evaluate the role of individual MAPKs in GG-NER using a flow cytometry-based DNA repair assay recently developed in our laboratory. This assay directly detects CPDs in partially denatured double-stranded DNA in intact permeabilized cells using highly specific fluorescently labeled anti-CPD antibodies. Although a similar method was previously reported over a decade ago (25), it was subsequently only very rarely used to address biological mechanisms.

## RESULTS

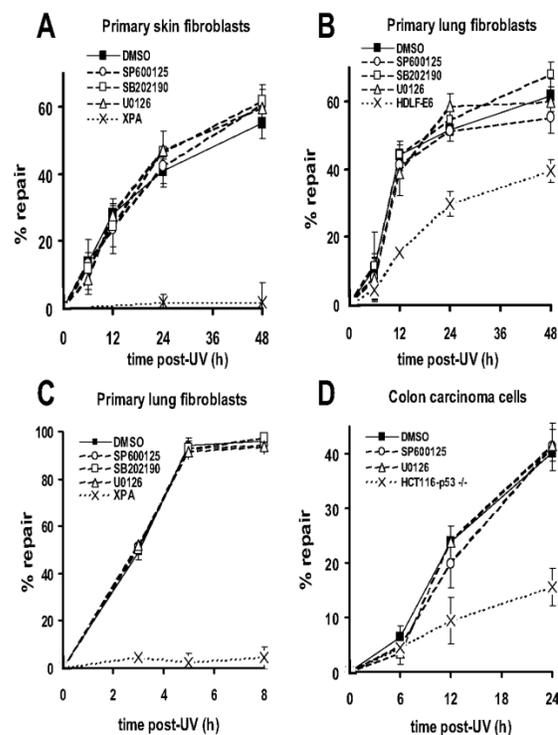
**UV-induced Activation and Pharmacological Abrogation of MAPK Activity in Human Cells**—Replicate cultures representing three human strains (*i.e.* to stringently control for cell type-specific effects that are highly characteristic of MAPK function) were irradiated with 10 J/m<sup>2</sup> UV (yielding ~5–10% relative clonogenic survival in each strain; data not shown) in the presence of either carrier (Me<sub>2</sub>SO) or well characterized, highly specific chemical MAPK inhibitors (*i.e.* U0126, SP600125, and SB202190) to abrogate signaling through ERK1/2, JNK1/2, and p38α/β, respectively (21, 23, 24). At various times post-UV, cultures were evaluated for levels of MAPK phosphorylation. In the case of HDLFs, phospho-JNK1/2 and phospho-p38α/β peaked at early times (0.5–1 h) and diminished rapidly thereafter, whereas phospho-ERK1/2 peaked at 0.5 h and remained elevated for at least 24 h (Fig. 1A). This correlated temporally with *in vitro* phosphorylation by phospho-ERK1/2, -JNK1/2, and -p38α/β of the specific downstream effectors Elk-1, c-Jun, and ATF2, respectively (Fig. 1B). Furthermore, incubation of HDLFs with chemical inhibitors



**FIGURE 3. Validation of a novel flow cytometry-based NER assay.** A, CPD induction in normal HDSEs as a function of dose. B and C, representative raw profiles depicting CPD repair kinetics for normal HDSEs and for NER-deficient XPA HDSEs, following UV exposure. The arrows indicate small artifactual shoulders in the flow cytometry curves, ostensibly generated by minor populations of doublet cells, which were routinely excluded from repair analysis.

We have now optimized this type of assay (i) to be rapid, reproducible, and extremely sensitive, detecting CPDs induced by UV doses as low as  $1 \text{ J/m}^2$  and (ii) to exhibit a linear dose response for CPD induction up to  $40 \text{ J/m}^2$  (Fig. 3A). Our optimized NER assay was initially applied to confluent UV-exposed HDSEs treated or not with MAPK inhibitors. (For all repair analyses described in this study, cells were synchronized by various approaches (see "Materials and Methods") to prevent cell division, which would otherwise dilute the CPD-specific immunofluorescence signal, thereby interfering with accurate determination of repair kinetics.) Representative raw data are shown for normal HDSEs and NER-deficient XPA HDSEs (Fig. 3, B and C), and the complete experiment in HDSEs is graphically illustrated in Fig. 4A. Relative to  $\text{Me}_2\text{SO}$ -treated controls, incubation with any of U0126, SP600125, or SB202190 had virtually no effect on CPD removal over a 48-h period in normal HDSEs, whereas GG-NER-deficient XPA HDSEs (negative control), in line with expectations, exhibited almost complete abrogation of CPD repair. For HDLFs, precisely the same trends with respect to CPD repair kinetics were

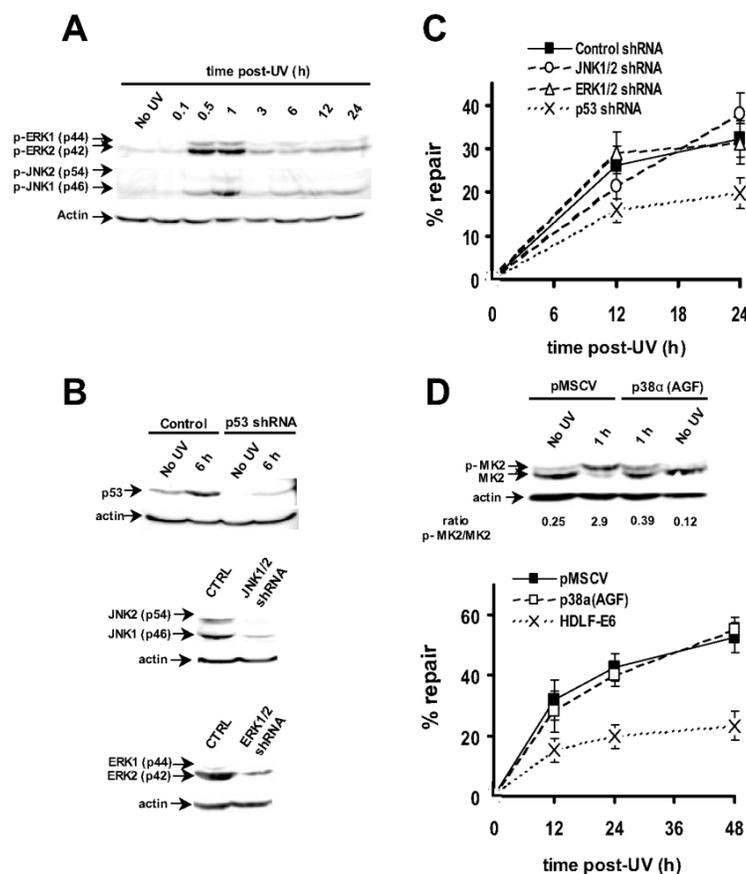
## The Role of MAPKs in UV Damage/Repair



**FIGURE 4. Flow cytometry-based evaluation of NER kinetics in UV-exposed human primary and tumor cell lines treated with chemical MAPK inhibitors.** A, kinetics of CPD removal in UV-exposed normal HDSEs and in UV-exposed XPA-deficient HDSEs (negative control), treated or not with MAPK inhibitors. B, kinetics of CPD removal in UV-exposed HDLF-E6 cells (negative control), treated or not with MAPK inhibitors. C, kinetics of 6-4PP removal in UV-exposed HDLFs and in UV-exposed XPA-deficient HDSEs (negative control), treated or not with MAPK inhibitors. D, kinetics of CPD removal in UV-exposed human HCT116  $p53^{+/+}$  colon carcinoma cells and in UV-exposed  $p53^{-/-}$  isogenic counterparts (HCT116  $p53^{-/-}$ ; negative control), treated or not with MAPK inhibitors. Each time point represents the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. DMSO,  $\text{Me}_2\text{SO}$ .

observed (Fig. 4B). Also, repair of another UV-induced bulky adduct, *i. e.* the 6-4PP (induced 5-fold less frequently than CPDs), was evaluated in HDLFs after irradiation with  $25 \text{ J/m}^2$  UV using a specific anti-6-4PP antibody. 6-4PPs are characteristically removed much more rapidly relative to CPDs via GG-NER in human and murine cells (26). In accord with this, we observed nearly 100% 6-4PP removal by 8 h post-UV in HDLFs; moreover, incubation of HDLFs with MAPK inhibitors engendered virtually no effect on repair of 6-4PP (Fig. 4C). In addition, as fully expected, HPV-E6-expressing HDLFs and XPA-deficient HDSEs (negative controls) manifested significant reductions in the removal of CPD and 6-4PP, respectively (Fig. 4, B and C). Finally, toward characterizing the potential influence of MAPKs on GG-NER in human tumor cells, pharmacological inhibition of signaling via ERK1/2 or JNK1/2 in HCT116  $p53^{+/+}$  had no significant impact on CPD repair kinetics (Fig. 4D). On the other hand, isogenic control  $p53$ -null HCT116/ $p53^{-/-}$  cells

## The Role of MAPKs in UV Damage/Repair



**FIGURE 5. Flow cytometry-based evaluation of NER kinetics in UV-exposed U2OS osteosarcoma cells following shRNA-mediated knockdown of ERK1/2 or JNK1/2 protein or in UV-exposed HDLFs following knockdown of p38 $\alpha$ / $\beta$  signaling via expression of dominant negative p38 $\alpha$  (AGF). A, activation profiles of ERK1/2 and JNK1/2 in UV-exposed U2OS cells. B, shRNA-mediated knockdown of p53, ERK1/2, and JNK1/2 in U2OS cells. C, kinetics of CPD removal in UV-exposed U2OS cells transiently transfected with shRNAs targeting ERK1/2 or JNK1/2. U2OS stably expressing shRNA targeting p53 is used as negative control. D, *top*, Western blot of phospho-MK2 induction in HDLFs irradiated with UV and expressing or not the p38 $\alpha$  (AGF) dominant negative mutant; *bottom*, kinetics of CPD removal in HDLFs expressing or not the p38 $\alpha$  (AGF) dominant negative mutant. HDLF-E6 cells are used as negative control. Each time point represents the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments.**

characteristically exhibited significantly reduced GG-NER efficiency relative to its isogenic p53-proficient counterpart.

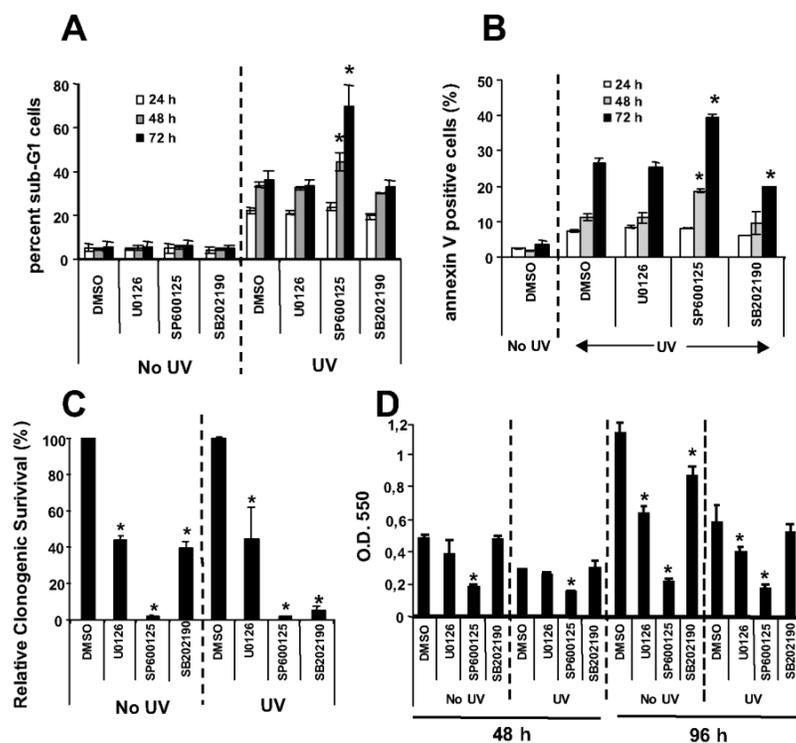
To reinforce the above data obtained in human primary or tumor cells treated with highly specific chemical MAPK inhibitors, human U2OS osteosarcoma cells were transiently transfected with shRNAs targeting either total ERK1/2 or total JNK1/2, followed by evaluation of GG-NER kinetics. As negative control for these studies, U2OS cells stably transduced with a retroviral vector expressing shRNA directed against p53 were employed. U2OS cells, like other cell lines evaluated in this study, exhibited maximal phosphorylation of JNK1/2 and of ERK1/2 by 0.5–1 h following irradiation with 10 J/m<sup>2</sup> UV (Fig. 5A). Transient transfection of U2OS with shRNAs targeting total ERK1/2 or total JNK1/2 or stable expression of an shRNA targeting p53 reduced protein expression by at least 70% (Fig.

5B). Nonetheless, consistent with our repair data using chemical MAPK inhibitors, no significant effect of ERK1/2 or JNK1/2 knockdown on GG-NER efficiency was observed (Fig. 5C). As fully expected, however, shRNA-mediated knockdown of p53 in U2OS cells significantly inhibited CPD removal. In addition to the shRNA experiments in U2OS cells described above, HDLFs were stably transduced with a retroviral vector expressing the dominant negative p38 $\alpha$  (AGF) mutant. Expression of this mutant, compared with HDLFs expressing an empty vector, resulted in a 5-fold reduction in the ratio of phosphorylated to unphosphorylated forms of the unique p38 $\alpha$ / $\beta$  substrate MK2, (Fig. 5D, *top*). Despite this indication that p38 $\alpha$ / $\beta$  signaling had been substantially reduced, no significant effect on the kinetics of GG-NER was observed (Fig. 5D, *bottom*), although HDLF-E6 cells, as expected, manifested a significant reduction in GG-NER capacity. We therefore undertook to characterize the effects of MAPK inhibitors on cell death and proliferation in HDLFs, either unstressed or

5B). Nonetheless, consistent with our repair data using chemical MAPK inhibitors, no significant effect of ERK1/2 or JNK1/2 knockdown on GG-NER efficiency was observed (Fig. 5C). As fully expected, however, shRNA-mediated knockdown of p53 in U2OS cells significantly inhibited CPD removal.

In addition to the shRNA experiments in U2OS cells described above, HDLFs were stably transduced with a retroviral vector expressing the dominant negative p38 $\alpha$  (AGF) mutant. Expression of this mutant, compared with HDLFs expressing an empty vector, resulted in a 5-fold reduction in the ratio of phosphorylated to unphosphorylated forms of the unique p38 $\alpha$ / $\beta$  substrate MK2, (Fig. 5D, *top*). Despite this indication that p38 $\alpha$ / $\beta$  signaling had been substantially reduced, no significant effect on the kinetics of GG-NER was observed (Fig. 5D, *bottom*), although HDLF-E6 cells, as expected, manifested a significant reduction in GG-NER capacity.

*Effects of MAPK Inactivation on Cell Death and Proliferation in Primary Human Lung Fibroblasts*—Having observed no effects on GG-NER as above, it became necessary to provide assurance that in our hands abrogation of MAPK signaling nonetheless generates some anticipated phenotypic outcomes. We therefore undertook to characterize the effects of MAPK inhibitors on cell death and proliferation in HDLFs, either unstressed or



**FIGURE 6. Modulation of cell death and proliferation by MAPK inhibitor treatment in mock- versus UV-irradiated ( $10 \text{ J/m}^2$ ) primary lung fibroblasts.** A, HDLFs were stained with propidium iodide at various times post-UV, and the percentage of the population in sub-G<sub>1</sub> was then evaluated by flow cytometry. B, quantification of annexin-V-positive cells (early apoptotic fraction) post-UV. C, effect of MAPK inhibition on clonogenic survival in HDLFs, either mock-irradiated or irradiated with  $10 \text{ J/m}^2$  UV. D, HDLFs were processed for determination of cellular proliferation by MTT assay at 48 h and 96 h post-UV as described under "Materials and Methods." For A–D, results represent an average of at least three independent experiments  $\pm$  S.E. \*,  $p < 0.05$ ; two-tailed unpaired  $t$  test. DMSO, Me<sub>2</sub>SO.

other cultured cell strains (29, 30). On the other hand, perhaps not surprisingly based on a dearth of previous studies to the contrary, no effect on UV-induced apoptosis was noted here upon ERK1/2 inactivation in HDLFs (Fig. 6, A and B). Finally, we observed a moderate but significant decrease in annexin V-positive staining at 72 h post-UV in SB202190-treated HDLFs (Fig. 6B), supporting a proapoptotic role for p38 $\alpha/\beta$  in UV-irradiated HDLFs, as previously observed in various cell lines (31). In addition, sub-G<sub>1</sub> peak analysis consistently revealed a slight reduction in UV-induced apoptosis in SB202190-treated cells, although this was not statistically significant (Fig. 6A).

Clonogenic survival and cellular proliferation by MTT assay were also evaluated in HDLFs treated or not with MAPK inhibitors. In line with previously reported tendencies in tumor cell lines (28, 32–35), abrogation of MAPK signaling in either mock- or UV-irradiated primary lung fibroblasts (i) significantly reduced long term colony-forming ability (Fig. 6C) and (ii) negatively impacted cellular proliferation by 96 h post-UV (Fig. 6D).

anxiety between these data in a murine system and ours in humans may be attributable to species-specific effects. In fact, rodent cells, relative to human, generally exhibit profoundly reduced expression of the GG-NER-specific protein UV-DDB2 and are consequently much less proficient in GG-NER (37), a significant caveat that may complicate interspecies comparisons.

Regarding previous reports in human cells, interference with JNK1/2 signaling was shown to engender cellular sensitivity to the UV-mimetic agent cisplatin as well as decreased post-treatment recovery of PCR amplification efficiency (DNA polymerase stop assay) (35, 38, 39). Although it was legitimately concluded that this might be attributable to deficient removal of cisplatin-induced DNA adducts, the affected repair pathway(s) could not be identified via the indirect polymerase stop assay employed. Indeed although cisplatin induces replication-blocking DNA *intrastrand* cross-links that are repaired by NER, this agent also generates a highly significant yield of replication-blocking DNA *interstrand* cross-links. The latter type of cross-link

## DISCUSSION

The current study provides solid evidence that abrogation of ERK1/2, JNK1/2, or p38 $\alpha/\beta$  activity in UV-exposed human primary and tumor cells via treatment with highly specific chemical inhibitors, although significantly influencing cell death and proliferation, has no effect whatsoever on the efficiency of GG-NER. This conclusion is strongly reinforced by experiments showing that repair is similarly unaffected following (i) transient shRNA-mediated knockdown of ERK1/2 or JNK1/2 in U2OS osteosarcoma cells or (ii) stable expression of a dominant negative p38 $\alpha$  mutant in HDLFs. We strongly emphasize that the observed lack of participation of MAPK signaling in human GG-NER is unexpected in light of previous reports. For example, UV-irradiated transformed mouse embryonic fibroblasts, either genetically null for the JNK1/2 effector *c-fos* or treated with SP600125, were shown to be deficient in GG-NER as determined by Southwestern blotting analysis using a specific anti-CPD antibody (29); furthermore, interference with *c-Fos*-mediated up-regulation of XPF (*i.e.* a structure-specific endonuclease required to incise DNA at damaged sites during NER) may underlie the observed effect (36). The apparent discrepancy

## The Role of MAPKs in UV Damage/Repair

represents a distinct class of adduct that requires (in addition to NER) the concerted action of multiple DNA repair pathways for efficient removal (*i.e.* homologous recombination, DNA mismatch repair, and DNA translesion synthesis) (40), any of which may be influenced by MAPK signaling. On the other hand, herein we have monitored DNA adduct repair in intact cells by direct quantification of CPDs or 6-4PPs, both of which are clearly removed exclusively by NER.

It is important to highlight another recent report that contributes to the burgeoning perception that MAPKs participate in the NER process. Specifically, ERK1/2 signaling was firmly linked to regulation of the essential NER core pathway protein ERCC1 in UV-exposed human hepatoma cells, and additionally, abrogation of ERK1/2 activation with U0126 was shown to possibly reduce the efficiency of UV DNA photoproduct removal as evaluated by a host cell reactivation assay (41). However, again (*i.e.* analogous to the situation for the aforementioned DNA polymerase stop assay) such an experimental approach, which measures post-UV recovery of plasmid-borne reporter gene expression, only indirectly reflects repair of RNA polymerase II-blocking lesions. Other caveats associated with the above study include the following: (i) DNA repair kinetics were not evaluated (*i.e.* recovery of transcription was examined only at 24 h post-UV), and curiously (ii) the putative effect of ERK1/2 on NER was observed following irradiation with 80 J/m<sup>2</sup> UV but not with 40, 60, or 120 J/m<sup>2</sup>.

It should be noted that although MAPKs apparently do not influence repair of CPDs within the genome overall via GG-NER in human cells, such an influence on repair along the transcribed strands of active genes via TC-NER (which is not measured by our GG-NER assay) cannot be entirely ruled out. Indeed, it is possible that MAPKs participate in TC-NER but not GG-NER by regulating the unique lesion recognition step of the former NER subpathway, involving, for example, activation of the TC-NER-specific proteins CS-A or CS-B and/or removal of stalled RNA polymerase II at damaged sites and subsequent recruitment of the core NER pathway.

The MAPKs comprise a preeminent mutagen-inducible cascade, which, by all previous indications, appeared to play a significant role in GG-NER. Nonetheless, here we have employed a highly sensitive DNA repair assay to directly demonstrate that MAPKs play no such role in cultured human cells. These data thus reorient our mechanistic perception of a critical antineoplastic DNA repair pathway. We also emphasize that aberrant MAPK signaling has been firmly implicated in diverse pathologies, including cancer, inflammation, and cardiovascular disorders; furthermore, MAPK inhibitors are currently being evaluated in therapy for such diseases (42, 43). The revelations provided by our study would ostensibly constitute an important consideration when designing treatment protocols that target the MAPK pathway.

*Acknowledgments*—We gratefully acknowledge Drs. Dindial Ramotar and Eric Milot for critically reading the manuscript.

## REFERENCES

- Melnikova, V. O., and Ananthaswamy, H. N. (2005) *Mutat. Res.* **571**, 91–106
- Kraemer, K. H., Patronas, N. J., Schiffmann, R., Brooks, B. P., Tamura, D., and DiGiovanna, J. J. (2007) *Neuroscience* **145**, 1388–1396
- Olaussen, K. A., Dunant, A., Fourret, P., Brambilla, E., Andre, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H. H., Stahel, R., Sabatier, L., Pignon, J. P., Tursz, T., Le Chevalier, T., and Soria, J. C. (2006) *N. Engl. J. Med.* **355**, 983–991
- Cleaver, J. E. (2005) *Nat. Rev. Cancer* **5**, 564–573
- Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protic, M., Hubscher, U., Egly, J. M., and Wood, R. D. (1995) *Cell* **80**, 859–868
- Mathonnet, G., Leger, C., Desnoyers, J., Drouin, R., Therrien, J. P., and Drobetsky, E. A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 7219–7224
- Ford, J. M., and Hanawalt, P. C. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 8876–8880
- Adimoolam, S., and Ford, J. M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12985–12990
- Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C., and Chu, G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 424–428
- Smith, M. L., Ford, J. M., Hollander, M. C., Bortnick, R. A., Amundson, S. A., Seo, Y. R., Deng, C. X., Hanawalt, P. C., and Fornace, A. J., Jr. (2000) *Mol. Cell Biol.* **20**, 3705–3714
- Rubbi, C. P., and Milner, J. (2003) *EMBO J.* **22**, 975–986
- Hildesheim, J., and Fornace, A. J., Jr. (2004) *DNA Repair* **3**, 567–580
- Bulavin, D. V., Saito, S., Hollander, M. C., Sakaguchi, K., Anderson, C. W., Appella, E., and Fornace, A. J., Jr. (1999) *EMBO J.* **18**, 6845–6854
- She, Q. B., Chen, N., and Dong, Z. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 20444–20449
- Huang, C., Ma, W. Y., Maxiner, A., Sun, Y., and Dong, Z. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12229–12235
- She, Q. B., Ma, W. Y., and Dong, Z. (2002) *Oncogene* **21**, 1580–1589
- Buschmann, T., Potapova, O., Bar-Shira, A., Ivanov, V. N., Fuchs, S. Y., Henderson, S., Fried, V. A., Minamoto, T., Alarcon-Vargas, D., Pincus, M. R., Gaarde, W. A., Holbrook, N. J., Shiloh, Y., and Ronai, Z. (2001) *Mol. Cell Biol.* **21**, 2743–2754
- Therrien, J. P., Drouin, R., Baril, C., and Drobetsky, E. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 15038–15043
- Loignon, M., and Drobetsky, E. A. (2002) *Carcinogenesis* **23**, 35–45
- Raingaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., and Davis, R. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 7420–7426
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemens, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., and Young, P. R. (1994) *Nature* **372**, 739–746
- Clifton, A. D., Young, P. R., and Cohen, P. (1996) *FEBS Lett.* **392**, 209–214
- Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O'Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S. S., Manning, A. M., and Anderson, D. W. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 13681–13686
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feese, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A., and Trzaskos, J. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18623–18632
- Berg, R. J., de Grijijl, F. R., Roza, L., and van der Leun, J. C. (1993) *Carcinogenesis* **14**, 103–106
- Mitchell, D. L., Haipek, C. A., and Clarkson, J. M. (1985) *Mutat. Res.* **143**, 109–112
- Liu, J., and Lin, A. (2005) *Cell Res.* **15**, 36–42
- Gururajan, M., Chui, R., Karuppanan, A. K., Ke, J., Jennings, C. D., and Bondada, S. (2005) *Blood* **106**, 1382–1391
- Christmann, M., Tomacic, M. T., Aasland, D., and Kaina, B. (2007) *Carcinogenesis* **28**, 183–190
- Potapova, O., Basu, S., Mercola, D., and Holbrook, N. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 28546–28553
- Jinlian, L., Yingbin, Z., and Chunbo, W. (2007) *J. Biomed. Sci.* **14**, 303–312
- Du, L., Lyle, C. S., Obey, T. B., Gaarde, W. A., Muir, J. A., Bennett, B. L., and Chambers, T. C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 11957–11966

33. Manke, I. A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M. Q., Elia, A. E., and Yaffe, M. B. (2005) *Mol. Cell* **17**, 37–48
34. Ussar, S., and Voss, T. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 43861–43869
35. Hayakawa, J., Depatie, C., Ohmichi, M., and Mercola, D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 20582–20592
36. Christmann, M., Tomicic, M. T., Origer, J., Aasland, D., and Kaina, B. (2006) *Nucleic Acids Res.* **34**, 6530–6539
37. Hanawalt, P. C. (2001) *Environ. Mol. Mutagen.* **38**, 89–96
38. Potapova, O., Haghghi, A., Bost, F., Liu, C., Birrer, M. J., Gjerset, R., and Mercola, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14041–14044
39. Gjerset, R. A., Lebedeva, S., Haghghi, A., Turla, S. T., and Mercola, D. (1999) *Cell Growth Differ.* **10**, 545–554
40. Nojima, K., Hoehegger, H., Saberi, A., Fukushima, T., Kikuchi, K., Yoshimura, M., Orelli, B. J., Bishop, D. K., Hirano, S., Ohzeki, M., Ishiai, M., Yamamoto, K., Takata, M., Arakawa, H., Buerstedde, J. M., Yamazoe, M., Kawamoto, T., Araki, K., Takahashi, J. A., Hashimoto, N., Takeda, S., and Sonoda, E. (2005) *Cancer Res.* **65**, 11704–11711
41. Andrieux, L. O., Fautrel, A., Bessard, A., Guillouzo, A., Baffet, G., and Langouet, S. (2007) *Cancer Res.* **67**, 2114–2123
42. Sebolt-Leopold, J. S., and Herrera, R. (2004) *Nat. Rev. Cancer* **4**, 937–947
43. Johnson, G. L., and Nakamura, K. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1341–1348

### The Role of MAPKs in UV Damage/Repair

## **ARTICLE 2**



## Requirement for functional DNA polymerase eta in genome-wide repair of UV-induced DNA damage during S phase

Yannick Auclair<sup>1</sup>, Raphael Rouget<sup>1</sup>, Jonathan M. Belisle, Santiago Costantino, Elliot A. Drobetsky\*

Maisonneuve-Rosemont Hospital, Research Center, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 January 2010

Received in revised form 23 March 2010

Accepted 29 March 2010

Available online 24 April 2010

#### Keywords:

Nucleotide excision repair

DNA polymerase eta

Cyclobutane pyrimidine dimer

6-4 photoproduct

### ABSTRACT

The autosomal recessive disorder *Xeroderma pigmentosum-variant* (XPV) is characterized (i) at the cellular level by dramatic hypermutability and defective recovery of DNA synthesis following UV exposure, and (ii) clinically by abnormal sunlight sensitivity and remarkable predisposition to skin cancer. These phenotypes are clearly attributable to germline mutations in *POLH*, encoding DNA polymerase eta ( $pol\eta$ ) normally required for accurate translesion DNA synthesis (TLS) past UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers. Here we demonstrate that patient-derived XPV-skin fibroblasts exposed to  $15\text{J}/\text{m}^2$  of UV also exhibit (in addition to abnormal TLS) a significant defect in global-genomic nucleotide excision repair (GG-NER) exclusively during S phase. This cell cycle-specific GG-NER defect can be complemented by ectopic expression of wild-type  $pol\eta$ , but not of  $pol\eta$  variants deficient in either nuclear relocalization or PCNA interaction. We highlight a previous study from our laboratory demonstrating that UV-exposed, ATR-deficient Seckel syndrome fibroblasts, like XPV fibroblasts, manifest strong attenuation of GG-NER uniquely in S phase populations. We now present further evidence suggesting that deficient S phase repair can be rescued in both XPV- and Seckel syndrome-cells if the formation of blocked replication forks post-UV is either prevented or substantially reduced, i.e., following, respectively, pharmacological inhibition of DNA synthesis prior to UV irradiation, or exposure to a relatively low UV dose ( $5\text{J}/\text{m}^2$ ). Our findings in cultured cells permit speculation that abrogation of GG-NER during S phase might partially contribute (in a synergistic manner with defective, atypically error-prone TLS) to the extreme state of UV-hypermutability leading to accelerated skin cancer development in XPV patients. Moreover, based on the overall data, we postulate that loss of either functional  $pol\eta$  or -ATR engenders abnormal persistence of stalled replication forks at UV-adducted sites in DNA which, in turn, can actively and/or passively trigger GG-NER inhibition.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Within the repertoire of human DNA repair pathways, nucleotide excision repair (NER) alone retains the capacity to remove “bulky DNA adducts” induced by a multitude of environmental mutagens and certain chemotherapeutic drugs. These adducts exhibit great structural diversity, but share in common the ability to distort the DNA helix and to strongly block both DNA replication and transcription. UV-induced cyclobutane pyrimidine

dimers (CPDs) and 6-4 pyrimidine–pyrimidone photoproducts (6-4PPs) have been extensively employed as model bulky DNA adducts to probe the function and regulation of NER [1]. This repair pathway faithfully restores the integrity of UV-damaged DNA through sequential steps of (i) DNA lesion recognition, (ii) unwinding of the DNA duplex around the damaged site, (iii) endonucleolytic incision within a number of bases on either side of the lesion, (iv) excision of the resulting (single-stranded) damaged DNA segment, creating a ~30 bp gap and, finally, (v) filling in and sealing of the gap (DNA repair synthesis), using the undamaged complementary strand as template in conjunction with various DNA polymerases/ligases. Two distinct NER subpathways have been characterized which differ only in the manner of lesion recognition: global-genomic NER (GG-NER) and transcription-coupled NER, operating at damaged sites anywhere within the genome and exclusively along the transcribed strand of active genes, respectively [2,3].

Individuals afflicted with “classical” *Xeroderma pigmentosum* (XP) harbour germline mutations in any among seven NER pathway genes, and as a result exhibit defective removal of solar UV-induced DNA photoproducts [4] leading to extreme photosensitivity and

*Abbreviations:* 6-4PP, (6-4) pyrimidine–pyrimidone photoproduct; ATR, ataxia telangiectasia and rad 3-related kinase; CPD, cyclobutane pyrimidine dimer; GG-NER, global-genomic nucleotide excision repair; NER, nucleotide excision repair;  $pol\eta$ , DNA polymerase eta; TLS, translesion DNA synthesis; XP, *Xeroderma pigmentosum*; XPV, *Xeroderma pigmentosum-variant*.

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

remarkably high rates of skin cancer [5]. Patients designated *Xeroderma pigmentosum-variant* (XPV) are clinically indistinguishable from classical XP counterparts; however strong evidence emerged early on that cells derived from the former carry out normal levels of DNA repair synthesis post-UV [6–8]. With only two exceptions to our knowledge [9,10] this was fully supported by subsequent reports [11–13], and in any case to the present day XPV cells are considered to be completely NER proficient. It has also been shown that XPV cells are characterized by (i) moderately increased UV-induced cytotoxicity but dramatically enhanced mutagenicity [14], and (ii) a significant delay in the time required to resume DNA synthesis post-UV [15]. Consistent with the above it was eventually revealed that XPV patients carry germline mutations in *POLH*, encoding DNA polymerase  $\eta$  ( $\text{pol}\eta$ ) [16].  $\text{pol}\eta$  belongs to the Y-family of specialized translesion DNA synthesis (TLS) polymerases (also including  $\text{pol}\mu$ ,  $\text{pol}\kappa$ , and  $\text{REV1}$ ), which collectively are able to replicate past a variety of helix-distorting DNA lesions that otherwise block the progression of normal replicative polymerases [17]. Following UV treatment  $\text{pol}\eta$  specifically becomes activated to bypass highly promutagenic CPDs, which is fortunate given its status as the only Y-family member capable of accomplishing this task with high fidelity [18,19].

As mentioned above, clear evidence has been presented demonstrating that XPV cells are NER proficient. Nonetheless we emphasize that, for technical reasons, a vast majority of previous studies which directly monitored the kinetics of UV DNA photoproduct removal was performed under conditions where replicating (S phase) cells are essentially eliminated from the analysis. In view of this, the primary aim of the current investigation was to compare the NER status of patient-derived XPV-skin fibroblasts vs. wild-type counterparts during each individual phase of the cell cycle. For this purpose we exploited a flow cytometry-based immunoassay, recently developed and validated in our laboratory, which permits quantification of GG-NER kinetics as a function of cell cycle [20]. We report here (i) that primary XPV-skin fibroblasts irradiated with UV exhibit profound deficiency in GG-NER during S phase, whereas repair during either G0/G1 or G2/M remains unaffected (GG-NER occurring in S phase is hereafter denoted S Phase Repair; SPR), and (ii) that this cell cycle-specific repair defect is attributable to loss of functional  $\text{pol}\eta$ . Of note we previously demonstrated that Seckel syndrome fibroblasts irradiated with UV also exhibit a significant reduction in SPR efficiency, specifically due to genetic abrogation of ATR kinase signaling [20]. We further reveal here that normal SPR can be restored in either XPV- or Seckel syndrome-cells by abolishing or substantially reducing the incidence of stalled replication forks at UV-adducted sites in DNA. Our findings may potentially provide some novel insight into the molecular underpinnings of XPV-associated UV-hypermotability leading to skin cancer development. The overall data in XPV- and Seckel syndrome-cells suggest that GG-NER can be actively and/or passively inhibited under conditions of particularly severe UV-induced

replicative stress, possibly resulting in enhanced cellular survival at the cost of greatly increased mutagenesis (see Section 4).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture

Wild-type primary skin fibroblasts (GM01652B) and three patient-derived XPV primary skin fibroblast strains (XP115LO, XP30RO, and XP5MA) were obtained from the Coriell Institute. The SV40-transformed XPV-skin fibroblast strain XP30ROsv, and its isogenic derivative ectopically expressing wild-type  $\text{pol}\eta$  (XP30ROsv- $\text{pol}\eta$ /cl6), were kindly provided by Dr. A.R. Lehmann (University of Sussex). Primary LL lung fibroblasts were a gift of Dr. J. Sedivy (Brown University). The hTERT-immortalized Seckel syndrome skin fibroblast strain F02-98 and the closely related wild-type counterpart 1BR were obtained from Dr. P. Jeggo (University of Sussex). All primary strains were cultured in Eagle's MEM supplemented with 15% foetal bovine serum, L-glutamine, and antibiotics (Wisent, Montreal, Canada). SV40-transformed and hTERT-immortalized cells were grown in Dulbecco's MEM supplemented as above.

### 2.2. Construction and ectopic expression of EGFP-tagged $\text{pol}\eta$ variants

Trizol<sup>TM</sup>-extracted total RNA from primary GM01652B skin fibroblasts was employed to synthesize a cDNA encoding full-length wild-type (wt)  $\text{pol}\eta$  by RT-PCR using primer pairs XPV1 (ATGGCTACTGGACAGGATCGAGT) and XPV2 (GGCAGCACTAATGTGTTAATG GCTT). The wt cDNA was then subcloned into the pGemT-Easy vector (Promega), which in turn was used as substrate to amplify the  $\text{pol}\eta$ -wt and  $\text{pol}\eta$ - $\Delta$ Ct cDNAs via PCR using *pfu* DNA polymerase (Stratagene) and primer pairs containing *XhoI* and *EcoRI* restriction sites (Table 1). These PCR products were cloned, in phase with EGFP at the C-terminal end of  $\text{pol}\eta$ , into the expression vector pEGFP-N1 (Clontech). The EGFP-tagged  $\text{pol}\eta$  mutant, termed here  $\text{pol}\eta$ -PIP1/2, was obtained by site-directed mutagenesis as described [21] using  $\text{pol}\eta$ -wt-pEGFP-N1 in conjunction with appropriate mutagenic primer pairs (Table 1). The DNA sequences of all EGFP- $\text{pol}\eta$  fusion vectors were verified by automated dideoxy sequencing (Core Sequencing Facility, University of Montreal).

XP30ROsv cell populations stably expressing each of the EGFP- $\text{pol}\eta$  fusion vectors were derived by transfection in the presence of Lipofectamine 2000<sup>TM</sup> (Invitrogen), followed by selection using 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 (Wisent, Montreal, Canada). Enrichment for EGFP-expressing cells was then performed by fluorescence-activated cell sorting (FACSVantage SE DiVa option equipped with a 70  $\mu\text{m}$  nozzle at 25PSI; Becton-Dickinson). Briefly cells were sorted based on EGFP autofluorescence level, cultured for seven days, re-sorted, and then cultured again for an additional week. Prior to experimentation

**Table 1**  
Primer pairs used for cloning  $\text{pol}\eta$ -wt and  $\Delta$ Ct cDNA in phase into pEGFP-N1 and for site-directed mutagenesis.

cDNA	Primers	Restriction sites	Sequence (5' → 3')
$\text{pol}\eta$ -wt	Forward	<i>XhoI</i>	GGACCGCTCGAGATGGCTACTGGACAGGAT
	Reverse	<i>EcoRI</i>	CTTTTCCTTGAATTCGATGTGTTAATGG
$\text{pol}\eta$ - $\Delta$ Ct	Forward	<i>XhoI</i>	GGACCGCTCGAGATGGCTACTGGACAGGAT
	Reverse	<i>EcoRI</i>	CTTTTCCTTGAATTCGTACCAGGGAGCCACT
Mutant	Point mutations	Mutagenic primers	Sequence (5' → 3') <sup>a</sup>
$\text{pol}\eta$ -PIP1/2	F443A; L444A (PIP1 mut)	Forward	TCTACAGACATCACCGCCGCCGAGCAGTGACCAAGTTC
		Reverse	GAACCTGGTCACTGCTCGCGCGCTGGTGATGTCGTAG
	F707A; F708A (PIP2 mut)	Forward	CAACATGGAAATCAGCTGCTAAGCCATTAACACATTAG
		Reverse	CTAATGTGTTAATGGCTAGCAGCTGATTCGAATGTTT

<sup>a</sup> Mutated sites in bold.

(i) EGFP autofluorescence was verified by flow cytometry and (ii) expression of each EGFP-pol $\eta$  fusion protein evaluated by immunoprecipitation and Western blotting using the primary polyclonal- and monoclonal-anti-POLH antibodies H-300 and B7, respectively (Santa Cruz).

### 2.3. UV irradiation

Cell monolayers were washed thoroughly with phosphate-buffered saline (PBS) and covered with 2 ml of PBS, followed by exposure to 254-nm UV using a Philips G25T8 germicidal lamp. The UV fluence was 0.2 J/m<sup>2</sup>/s as measured with a DRC100X digital radiometer equipped with DIX254 sensor (Spectroline Corporation).

### 2.4. Protein detection by Western blotting

Pol $\eta$  was detected by immunoprecipitation and Western blotting as described [22,23]. The supernatant was stored at –80 °C and used in conjunction with anti-actin antibody to verify that equal total protein had been employed for the immunoprecipitation (loading 5% of total input).

To evaluate siRNA knockdown of pol $\eta$  in primary LL lung fibroblasts, chromatin-bound protein was detected using a protocol that initially removes soluble polypeptides by extraction in cytoskeleton buffer (CSK; 10 mM Pipes (pH 6.8), 300 mM sucrose, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 20 mM vanadyl ribonucleoside complex, 1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride). Specifically, 1 × 10<sup>6</sup> cells were lysed with 0.5% Triton-X-100/CSK for 15 min on ice and centrifuged. The pellets were incubated with 0.5% Triton-X-100/CSK buffer for an additional 15 min, centrifuged, and resuspended in 30  $\mu$ l 1 × Laemmli buffer for Western blotting. Pol $\eta$  was detected using anti-POLH polyclonal antibody (H-300; Santa Cruz, 1:1000 dilution). As loading control, the membrane was stripped and re-hybridized with anti-PCNA antibody (PC-10, Santa Cruz).

### 2.5. Localization of ectopically expressed pol $\eta$ -EGFP fusion proteins in XP30ROsv cells

Cells were grown for 24 h on glass coverslips in 35-mm culture dishes, fixed with 3.7% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, followed by thorough washing with PBS. Cells were mounted with ProLong<sup>TM</sup> Gold antifade reagent containing DAPI counterstain (Molecular Probes–Invitrogen). Stained cells were then photographed and analyzed using an inverted fluorescence Zeiss Axio Observer A1 microscope equipped with QICAM FAST 1394 camera (QImaging, Canada) and Northern Eclipse software (Empix Imaging Canada).

### 2.6. Live cell imaging of pol $\eta$ nuclear foci

XP30ROsv cells (6 × 10<sup>4</sup>) expressing either EGFP-pol $\eta$ -wt or EGFP-pol $\eta$ -PIP1/2 were seeded on 35-mm glass-bottom dishes and cultured for 24 h in Opti-MEM medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS and antibiotics. Live cells were irradiated, or mock-irradiated, with 15 J/m<sup>2</sup> of UV and analyzed using a fluorescence microscope (IX71 Olympus, Japan) with a 100 × 1.45NA oil immersion objective. The images were acquired with a Retiga 2000R CCD (QImaging, Canada). The microscope was equipped with a MAX201 motorized stage (Thorlabs, NJ), and both the stage and camera were controlled by a custom program written in Labview (National Instrument, TX) to acquire 100 (10 × 10) contiguous images covering a 1.18 mm × 0.88 mm region with submicron resolution. The same region was imaged before, and 1.5 h after, UV irradiation.

Nuclear foci were detected and quantified using an automatic custom image analysis program written in MatLab (Mathworks, MA). To perform this quantification, an intensity threshold was first established using the method of Otsu [24]. Foreground pixels were used as masks to specifically select nuclei. A two-dimensional filter using Gaussian kernel was applied to detect only elements of a certain size (approximately 0.5  $\mu$ m) and foci were identified as local maxima. At least 50 cell pairs were analyzed in the case of each EGFP-pol $\eta$ -expressing XP30ROsv strain.

### 2.7. siRNA-mediated depletion of pol $\eta$

Cells (2 × 10<sup>5</sup>) were seeded on 35 mm dishes in complete growth medium without antibiotics. After 24 h, each culture was transfected with siRNAs targeting human pol $\eta$  (sc-36289), or nontargeting control siRNAs (sc-37007) (Santa Cruz), employing Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's directions (Invitrogen). Cells were used for experiments at 2 days post-transfection after verifying pol $\eta$  knockdown by Western blotting.

### 2.8. Treatment with DNA synthesis inhibitors

Cells were cultured for 2 h in fresh complete medium containing either 15  $\mu$ g/ml aphidicolin (Sigma) or 10 mM hydroxyurea (Sigma). The medium was then removed, and cells thoroughly washed with PBS followed by UV irradiation in PBS. Fresh complete medium without inhibitor was added for post-UV incubations.

### 2.9. Clonogenic survival

Exponentially growing cultures on 100-mm dishes were irradiated with 0, 7.5, or 15 J/m<sup>2</sup> of UV, and immediately trypsinized for plating of appropriate cell numbers on 100-mm dishes in fresh complete medium. Following 15 days incubation, colonies were stained with 0.5% methylene blue (w/v) in 50% methanol (v/v). Survival is expressed as a percentage relative to mock-irradiated cells.

### 2.10. Determination of GG-NER kinetics as a function of cell cycle

The removal of 6-4PPs in each phase of the cell cycle was monitored over a 6 h period as previously described [20] with the following exception. In the case of XP30ROsv cells stably expressing EGFP-pol $\eta$  fusion proteins, since EGFP autofluorescence interferes with the FITC signal, Alexa-Fluor700-conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probes–Invitrogen, dilution 1:400) was used as secondary antibody in place of FITC-conjugated rabbit anti-mouse antibody. The acquisition was performed using an LSRII flow-cytometer (Becton-Dickinson) equipped with argon (blue, 488 nm)- and helium–neon (red, 633 nm)-lasers.

For cell cycle-specific evaluation of CPD repair kinetics up to 24 h, to control for cellular proliferation during post-UV incubations, a triple-labeling approach employing BrdU in conjunction with PI and anti-CPD antibody was optimized. Monolayers at 50% confluence were irradiated with either 5 or 15 J/m<sup>2</sup> of UV. For time zero (0 h) cells were pulsed for 30 min with 30  $\mu$ M of BrdU, irradiated, and then immediately harvested. For later time points, to avoid potential artefacts associated with BrdU photolysis, cells were pulsed for 30 min immediately following irradiation, rinsed with PBS, and re-fed with fresh medium for the remaining incubation period. At the various time points, monolayers were washed with PBS, trypsinized, resuspended in 1 ml of PBS, and fixed by addition of 3 ml of ice-cold 100% ethanol. Fixed cells (5 × 10<sup>5</sup>) were pelleted, washed with PBS, and incubated for 20 min at 22 °C with 0.5% Triton-X-100 in 2N HCl followed by centrifugation and resuspension in 0.1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pH 9 for 20 min. Cells were washed

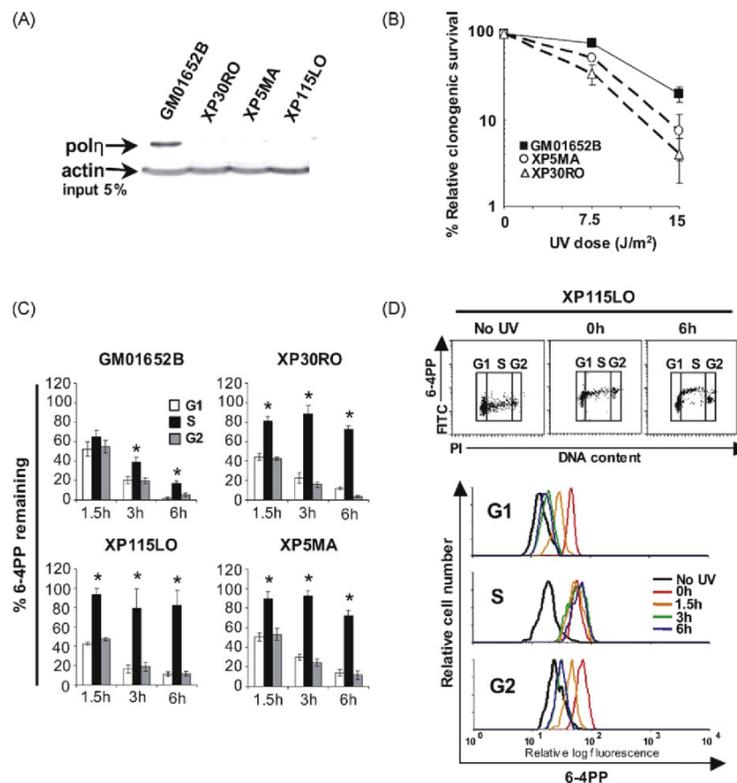
with PBS, resuspended in 300  $\mu$ l of RNase solution (100  $\mu$ g/ml in PBS), incubated for 1 h, and washed with 1 ml of PBS-TB (1% BSA/0.25% Tween-20/PBS). Cells were then centrifuged and resuspended in 300  $\mu$ l of PBS-TB containing anti-CPD antibody (Kamiya Biomedical Company; 1:1000 dilution), incubated for 1.5 h at 22 °C, washed twice with PBS-TB, and incubated with FITC-conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody (Sigma; 1:200) in 300  $\mu$ l PBS-TB at 22 °C for 1 h in the dark. Cells were rinsed once with PBS-TB and incubated for 15 min with IgG isotype control (Invitrogen; 1:100 dilution). After washing with PBS-TB, cells were incubated with an Alexa-Fluor647-conjugated anti-BrdU antibody (Molecular Probes-Invitrogen; 1:200 dilution) in PBS-TB for 1 h, rinsed with PBS-TB, centrifuged and resuspended in PBS containing 5  $\mu$ g/ml of PI, and finally analyzed using a FAVCS Caliber flow cytometer (Becton-Dickinson, USA). Fluorescence intensity of UV photoproducts was obtained by gating the appropriate phase of the cell cycle on a bivariate dot plot. Quantification of the change in geometric mean fluorescence of the population over time indicates repair.

### 3. Results

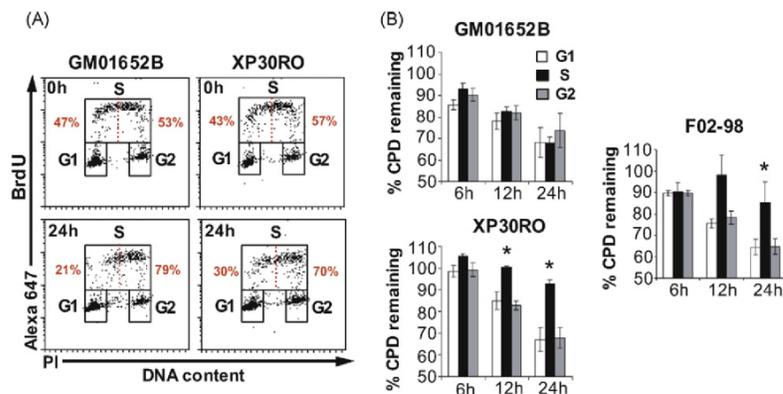
#### 3.1. DNA repair status of XPV-skin fibroblasts revisited

The efficiency of 6-4PP removal as a function of cell cycle was initially quantified in four primary skin fibroblast strains: wild-type

GM01652B vs. the XPV strains XP115LO, XP5MA, and XP30RO. The latter three strains are reported to carry severe *pol* $\eta$  truncations and no detectable full-length protein, which was substantiated by Western blotting (Fig. 1A). Moreover in line with previous observations [25], XPV fibroblast strains displayed moderately decreased longterm clonogenic survival post-UV relative to the wild-type counterpart (Fig. 1B). For DNA repair rate determinations, briefly, replicate cultures were irradiated with 15 J/m<sup>2</sup> of UV and incubated for 0, 1.5, 3, or 6 h. Following harvesting, fixation, and permeabilization, cells were incubated with fluorescently labeled anti-6-4PP antibody and co-stained with propidium iodide (PI). Flow cytometry was then used to analyze the extent of 6-4PP removal for populations gated in each phase of the cell cycle, as graphically depicted for all primary skin fibroblast strains (Fig. 1C). A representative bivariate dot plot (Fig. 1D; upper panel) and histogram overlay (Fig. 1D; lower panel) show raw data for XP115LO. It is well established that 6-4PP repair in human fibroblasts is virtually complete (80–100% removal) by 6–8 h post-UV [26]. In accord with this (and as we previously observed [20]), wild-type GM01652B fibroblasts exhibit >90% repair of 6-4PP during either G0/G1 or G2/M by 6 h following UV treatment, and a very moderate but significant slowdown during S (80% removal) (Fig. 1C). Strikingly, however, each of the XPV strains XP115LO, XP5MA, and XP30RO is shown to be significantly defective in 6-4PP removal during S, while displaying characteristically rapid repair kinetics during other phases.



**Fig. 1.** SPR of 6-4PPs is defective in primary XPV-skin fibroblasts. (A) Detection of *pol* $\eta$  in XPV vs. wild-type primary skin fibroblasts by immunoprecipitation and Western blotting. (B) Relative clonogenic survival in UV-irradiated wild-type-skin vs. XPV-skin fibroblasts. Shown is the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. (C) Graphical depiction of repair in wild-type-skin vs. XPV-skin fibroblasts irradiated with 15 J/m<sup>2</sup> of UV. Shown is the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \**p* < 0.05; two-tailed paired *t*-test (S phase relative to G1). (D) Representative results illustrating cell cycle-specific 6-4PP repair in the XPV strain XP115LO. Upper panel; bivariate distribution of 6-4PP (FITC) versus DNA content (PI) at 0 and 6 h post-UV, and in unirradiated cells (no UV); lower panel; histogram overlay showing repair of 6-4PPs in each phase of the cell cycle.



**Fig. 2.** SPR of CPDs is defective in primary XPV-skin fibroblasts. (A) Bivariate distribution of BrdU incorporation (Alexa 647) vs. DNA content (PI) in GM01652B vs. XP30RO at 0h vs. 24h post-UV. The red dotted line and numerals indicate the percentage of cells in early- vs. late-S phase. (B) Graphical depiction of cell cycle-specific CPD repair in GM01652B, XP30RO, and F02-98 cells irradiated with  $15\text{ J/m}^2$  of UV. Shown is the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ ; two-tailed paired  $t$ -test (S phase relative to G1).

The initial induction level of CPDs post-UV is 3–5 times higher than 6-4PPs; moreover the former adduct is excised with much slower kinetics, i.e., only 30–40% CPD removal by 24h post-UV, compared with the relatively very rapid 6-4PP repair rate as discussed immediately above. For these and other reasons, CPDs as opposed to 6-4PPs have been considered the preeminent cause of sunlight-induced mutations leading to skin cancer development [27]; thus any defect in CPD repair *per se* could conceivably represent an important factor in XPV pathogenesis. Moreover efficient removal of either CPDs or 6-4PPs can vary according to genetic background, e.g., reduced GG-NER of CPDs but not of 6-4PPs in cells lacking a functional p53 tumour suppressor [28], or in XPE fibroblasts characterized by deficiency in the GG-NER lesion recognition protein DDB2 [29]. Finally we were interested to probe whether defective SPR in XPV cells could persist for as long as 24h post-UV. The above considerations highlighted the importance of confirming whether SPR of CPDs, in addition to 6-4PPs, is defective in XPV cells.

However quantification of CPDs as a function of cell cycle, relative to the situation for 6-4PPs, poses a distinct technical challenge. Indeed the precision of our cell cycle-specific GG-NER assay depends upon the ability to tightly control for movement of cells between various growth phases during post-UV incubations. It is well established that UV-exposed cultured cells exhibit a transient period of growth arrest and inhibition of DNA synthesis, the length of which depends upon dose as well as cellular capacity to remove replication-blocking UV DNA photoproducts [30,31]. Consistent with this we have observed that all strains used herein exhibit complete arrest of cell cycle progression for at least 6h post-irradiation with  $15\text{ J/m}^2$  of UV but, to varying extents, resume proliferating thereafter. For our studies on 6-4PP repair, this timeline has been favourably exploited. Indeed since removal of this photoproduct is normally complete by 6–8h post-UV, repair kinetics can be conveniently evaluated in each of G0/G1, S, and G2/M by simple gating of PI-stained populations (as we have done here and in the past [20]). However in order to monitor GG-NER of CPDs as a function of cell cycle over a 24h period, it is necessary to further carefully control for cellular proliferation during post-UV incubations. We therefore modified our flow cytometry-based assay to include a third label, i.e., BrdU in addition to PI and anti-CPD antibody, thereby allowing positive tracking of cells which are in S phase at the time of irradiation. Fig. 2A displays a representative dot plot of BrdU staining as function of DNA content at 0 and 24h for wild-type GM01652B

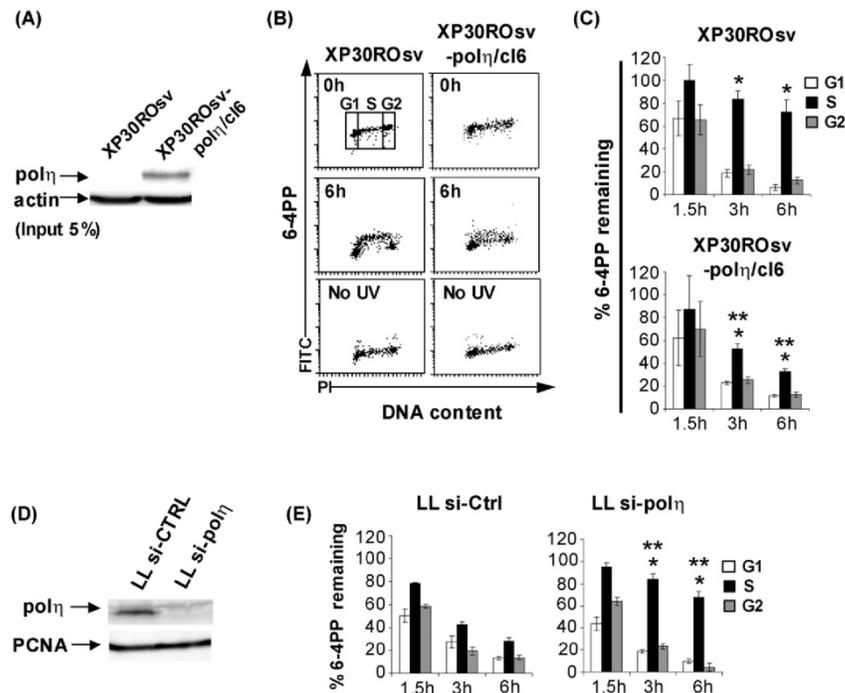
fibroblasts vs. the XPV strain XP30RO. The vertical dashed red line (delineating early- from late-S phase) and red numerals highlight the degree of cell cycling within S phase over a 24h period. Repair analysis of the appropriate populations (i.e., gated as shown in Fig. 2A) shows that CPD removal is significantly reduced uniquely during S phase in either  $\text{pol}\eta$ -deficient XP30RO, or as previously shown in ATR-deficient F02-98 [20], whereas normal repair during all phases is observed in wild-type GM01652B (Fig. 2B). Our results displayed thus far demonstrate that cultured primary XPV-skin fibroblasts irradiated with  $15\text{ J/m}^2$  of UV are defective in genome-wide removal of both 6-4PPs and CPDs exclusively during S phase, and that this defect persists up to at least 24h post-UV.

### 3.2. Defective SPR in XPV cells is attributable to loss of functional $\text{pol}\eta$

In order to test whether loss of functional  $\text{pol}\eta$  underlies the observed SPR defect in XPV cells, we determined cell cycle-specific kinetics of 6-4PP removal in SV40-transformed XP30ROsv vs. the same strain wherein wild-type  $\text{pol}\eta$  had been ectopically re-expressed (XP30ROsv- $\text{pol}\eta/\text{cl6}$ ) [32,33] (Fig. 3A). As expected based on our results in primary XPV cells,  $\text{pol}\eta$ -deficient XP30ROsv exhibits marked deficiency in 6-4PP repair uniquely during S phase; however, of note, this defect is significantly rescued in XP30ROsv- $\text{pol}\eta/\text{cl6}$  (Fig. 3B and C). Furthermore primary LL lung fibroblasts were transfected with siRNAs targeting  $\text{pol}\eta$ , resulting in strong knockdown of the protein (Fig. 3D). In full accord with the results for XP30ROsv vs. XP30ROsv- $\text{pol}\eta/\text{cl6}$ ,  $\text{pol}\eta$ -depleted LL cells manifest dramatic loss of SPR but normal repair during G0/G1 or G2/M, whereas DNA photoproduct removal is unaffected during all phases in counterparts expressing control scrambled siRNAs (Fig. 3E).

### 3.3. Proper-nuclear localization, -focus formation, and -PCNA binding activity of $\text{pol}\eta$ appear necessary for efficient SPR in UV-exposed skin fibroblasts

Towards elucidating the functional basis of the requirement for  $\text{pol}\eta$  in SPR, two previously characterized EGFP-tagged  $\text{pol}\eta$  domain variants were constructed: (i) EGFP- $\text{pol}\eta$ - $\Delta\text{Ct}$  (initially designated  $\text{pol}\eta$ -642n) [32], carrying a 70 amino acid C-terminal truncation which eliminates the canonical nuclear localization signal NLS2 at positions 682–698, and (ii) EGFP- $\text{pol}\eta$ -PIP1/2, mutated in the two PCNA-interacting domains (PIP1 and PIP2) normally



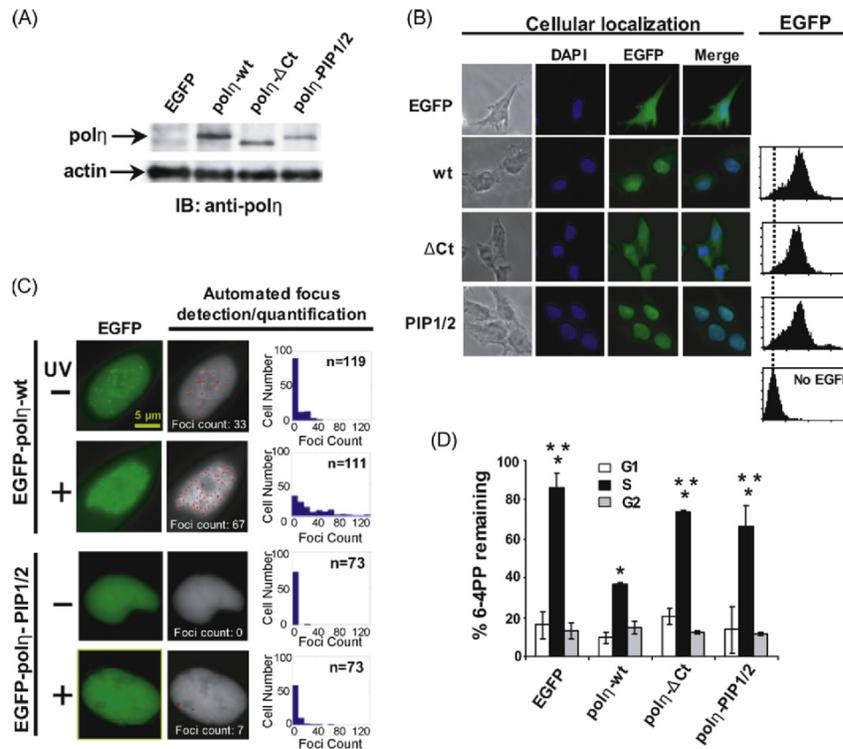
**Fig. 3.** Defective SPR in XPV cells is attributable to loss of functional pol $\eta$ . (A) Detection of pol $\eta$  in XP3OROsv vs. XP3OROsv-pol $\eta$ /cl6 by immunoprecipitation and Western blotting. (B) Representative bivariate distributions of 6-4PP (FITC) vs. DNA content (PI) in XP3OROsv and XP3OROsv-pol $\eta$ /cl6 irradiated with 15 J/m<sup>2</sup> of UV. (C) Graphical depiction of repair in XP3OROsv vs. XP3OROsv-pol $\eta$ /cl6 irradiated with 15 J/m<sup>2</sup> of UV. Shown is the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ ; two-tailed paired  $t$ -test (S phase relative to G1). \*\* $p < 0.05$ ; two-tailed unpaired  $t$ -test comparing SPR in XP3OROsv-pol $\eta$ /cl6 vs. XP3OROsv. (D) Detection of pol $\eta$  in primary LL lung fibroblasts expressing either siRNAs targeting pol $\eta$  or control scrambled siRNAs. (E) Graphical depiction of repair in LL fibroblasts irradiated with 15 J/m<sup>2</sup> of UV. Shown is the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ ; two-tailed paired  $t$ -test (S phase relative to G1). \*\* $p < 0.05$ ; two-tailed unpaired  $t$ -test comparing SPR in LL si-pol $\eta$  vs. LL si-CTRL.

required for accumulation at DNA replication foci, and for DNA synthetic activity, of pol $\eta$  [34]. Each of the above mutants, in addition to wild-type pol $\eta$  (EGFP-pol $\eta$ -wt), was stably expressed in XP3OROsv cells (Fig. 4A). In line with prior work [32], EGFP-pol $\eta$ - $\Delta$ Ct exhibits both nuclear and cytoplasmic localization, as contrasted with the primarily nuclear localization of EGFP-pol $\eta$ -wt (Fig. 4B). In addition EGFP-pol $\eta$ -PIP1/2, although proficient in nuclear localization (Fig. 4B) as previously observed [34], is defective relative to EGFP-pol $\eta$ -wt in either spontaneous- or UV-induced pol $\eta$  nuclear focus formation (Fig. 4C). Further analysis revealed that EGFP-pol $\eta$ -wt, when ectopically expressed in XP3OROsv, restores SPR of 6-4PPs to a normal level as determined at 6 h post-UV (Fig. 4D, compare with Fig. 3C). In contrast, expression of either EGFP-pol $\eta$ - $\Delta$ Ct or EGFP-pol $\eta$ -PIP1/2 in XP3OROsv failed to engender any improvement in repair capacity. These data indicate that both proper subcellular localization, focus formation, and PCNA binding activity of pol $\eta$  are required to ensure the efficient removal of UV-induced damage in replicating cells.

#### 3.4. Abrogation of semiconservative DNA synthesis prior to UV exposure rescues defective SPR in either XPV- or Seckel syndrome fibroblasts

ATR and pol $\eta$  are well known to play central roles in maintaining replication fork stability in UV-exposed cells (see Section 4), and we have demonstrated herein and elsewhere [20] that both proteins are required for repair of UV-induced DNA damage uniquely during

S phase. As such it is tempting to speculate upon a link between DNA replication and GG-NER of replication-blocking DNA adducts. To approach this possibility, we evaluated 6-4PP removal as a function of cell cycle in XP3OROsv vs. XP3OROsv-pol $\eta$ /cl6, each of which had been treated or not prior to UV irradiation with either (i) 15  $\mu$ g/ml of aphidicolin, a powerful inhibitor of replicative DNA polymerases [35], or (ii) 10 mM hydroxyurea (HU), which precludes semiconservative DNA synthesis via ribonucleotide reductase inhibition and subsequent depletion of dNTP pools [36]. DNA replication was profoundly reduced following treatment with either inhibitor as determined by BrdU incorporation (Fig. 5A). In accord with results shown in Fig. 3C, XP3OROsv exhibits abrogation of 6-4PP removal uniquely during S phase as determined at 6 h post-UV; however under conditions where DNA synthesis is inhibited by either aphidicolin or HU pre-treatment, SPR capacity is significantly restored (Fig. 5B). As expected, XP3OROsv-pol $\eta$ /cl6 cells manifest a much more moderate SPR defect relative to XP3OROsv (compare with Fig. 3C) which, interestingly, also appears to be rescued by pre-treatment with aphidicolin. We next evaluated the effects of DNA synthesis inhibition on SPR of 6-4PP in ATR-deficient F02-98 Seckel syndrome fibroblasts, compared with the closely related wild-type strain 1BR. Incubation with aphidicolin prior to UV irradiation markedly reduced DNA synthesis in both strains (Fig. 5C). As fully anticipated based on our previous findings [20], F02-98 displayed profound deficiency in SPR as determined at 6 h post-UV; moreover, mirroring the results for XP3OROsv, aphidicolin treatment completely resolved this defect (Fig. 5D). The above data



**Fig. 4.** Analysis of XP30ROsv cells ectopically expressing EGFP-tagged  $\text{pol}\eta$  variants. (A) Stable expression of EGFP- $\text{pol}\eta$  variants in XP30ROsv detected by immunoprecipitation and Western blotting. (B) Left panel, cellular localization of EGFP- $\text{pol}\eta$  variants in XP30ROsv cells as determined by EGFP autofluorescence in fixed unirradiated cells. Right panel: EGFP autofluorescence peaks in living XP30ROsv cells. (C) Quantification of EGFP- $\text{pol}\eta$  foci in living XP30ROsv cells expressing either EGFP- $\text{pol}\eta$ -PIP1/2 or EGFP- $\text{pol}\eta$ -wt. In each case, the same cells were imaged before (–) and 1.5 h after (+) irradiation with  $15\text{ J/m}^2$  of UV. Shown on the left are representative nuclei and automated focus counts (see Section 2). Histograms on the right show automated determinations of focus count distribution for the indicated number of cells. (D) Graphical depiction of 6-4PP removal as determined at 6 h following exposure to  $15\text{ J/m}^2$  of UV in XP30ROsv cells expressing the indicated EGFP- $\text{pol}\eta$ -variants. Shown is the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. \* $p < 0.05$ ; two-tailed paired  $t$ -test (S phase relative to G1). \*\* $p < 0.05$ ; two-tailed unpaired  $t$ -test comparing S phase repair in XP30ROsv cells expressing EGFP- $\text{pol}\eta$ -wt vs. empty vector (EGFP) or EGFP- $\text{pol}\eta$  domain mutants.

indicate that, under conditions where the formation of blocked replication forks at UV-damaged sites in DNA is prevented, defective SPR in both XPV- and Seckel syndrome-cells is significantly rescued.

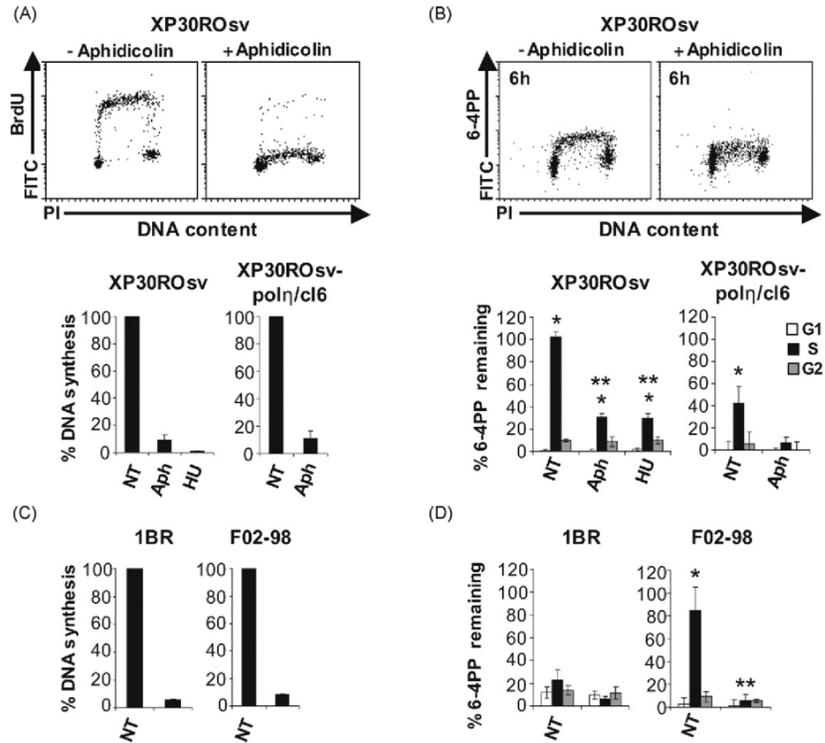
### 3.5. Defective SPR is not observed in XPV or Seckel syndrome fibroblasts irradiated with a relatively low dose ( $5\text{ J/m}^2$ ) of UV

The above experiments were all performed on cells treated with  $15\text{ J/m}^2$  of 254-nm UV. Doses within this range (i.e.,  $10\text{--}20\text{ J/m}^2$ ) have been extensively employed over the years to evaluate GG-NER kinetics in cultured human cells. However it should be emphasized that in general CPD repair rates can vary significantly with dose, although the underlying reasons are not entirely clear [37]. In light of this, our triple-labeling approach was used to investigate the extent to which defective SPR, as observed in XPV- and Seckel syndrome-cells irradiated with  $15\text{ J/m}^2$  of UV, might also occur at a lower dose of  $5\text{ J/m}^2$ . A representative dot plot of BrdU staining as a function of DNA content at 0 and 24 h for wild-type GM01652B fibroblasts vs. the XPV strain XP30RO irradiated with  $5\text{ J/m}^2$  of UV is shown (Fig. 6A). It is apparent that GM01652B resumes proliferating very rapidly at the lower dose such that it is not possible under our assay conditions to accurately measure CPD repair at any point after 12 h post-UV, or even to differentiate between G0/G1

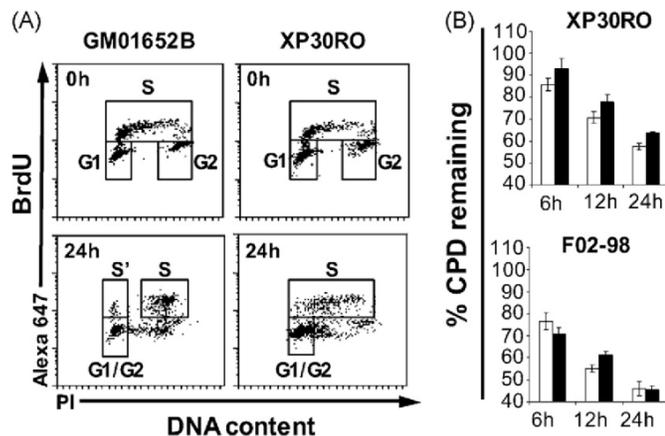
and G2/M cells. Indeed the gated populations in Fig. 6A, designated “G1/G2”, actually represent a mixture of cells which were in either G0/G1 or G2/M at the time of irradiation. On the other hand in the case of both XPV- and Seckel syndrome fibroblasts recovery of DNA synthesis post-UV is, as expected, considerably slower than wild-type fibroblasts, rendering it possible to compare repair kinetics in the former two strains up to 24 h post-UV during S vs. “G1/G2”. Relative to the situation for cells irradiated with  $15\text{ J/m}^2$  of UV (Fig. 2), following exposure to  $5\text{ J/m}^2$  both XP30RO and F02-98 each exhibit rates of CPD repair during S that are more comparable to those during G1/G2 (Fig. 6B). The overall data suggest the existence of a dose threshold for SPR inhibition in the case of either  $\text{pol}\eta$ - or ATR-deficient cells. Furthermore it is possible that this threshold may be determined by levels of replication stress, as such levels are expected to be considerably lower in cells irradiated with  $5\text{ J/m}^2$  vs.  $15\text{ J/m}^2$  of UV.

## 4. Discussion

Here we demonstrate that patient-derived XPV-skin fibroblasts irradiated with  $15\text{ J/m}^2$  of 254-nm UV are characterized by a significant reduction in GG-NER efficiency uniquely during S phase due to loss of functional  $\text{pol}\eta$ . Further evidence is presented suggesting that this repair defect is rescued in either XPV- or Seckel



**Fig. 5.** Defective SPR in XPV fibroblasts is rescued by treatment with DNA synthesis inhibitors prior to UV exposure. (A) Upper panel: representative dot plot showing BrdU incorporation in XP3OROs cells pre-treated or not with aphidicolin. Lower panel: graphical depiction of percent DNA synthesis inhibition in XP3OROs and XP3OROs-polη/cl6 pre-treated or not with HU and/or aphidicolin. (B) Upper panel: representative dot plot showing 6-4PP repair as function of DNA content at 6h post-UV (15 J/m<sup>2</sup>) in XP3OROs vs. XP3OROs-polη/cl6 cells pre-treated or not with aphidicolin. Lower panel: graphical depiction of 6-4PP repair as a function of cell cycle at 6h post-UV in XP3OROs vs. XP3OROs-polη/cl6 pre-treated or not with aphidicolin or HU. (C) Graphical depiction of percent DNA synthesis inhibition in 1BR wild-type and F02-98 Seckel syndrome skin fibroblasts pre-treated or not with aphidicolin. (D) Graphical depiction of 6-4PP repair at 6h post-UV as a function of cell cycle in 1BR vs F02-98 pre-treated or not with aphidicolin. Shown is the mean ± SEM of three independent experiments \**p* < 0.05; two-tailed paired *t*-test (S phase relative to G1). \*\**p* < 0.05; two-tailed unpaired *t*-test comparing S phase repair in aphidicolin or HU treated vs. untreated (NT) cells.



**Fig. 6.** Normal SPR of CPDs in XPV- and Seckel syndrome-cells irradiated with 5 J/m<sup>2</sup> of UV. (A) Bivariate distribution of BrdU incorporation (Alexa 647) vs. DNA content (PI) in GM01652B vs. XP3ORO at 0h vs. 24h following irradiation with 5 J/m<sup>2</sup> of UV. (B) Graphical depictions of cell cycle-specific CPD repair in XP3ORO and F02-98 cells treated with 5 J/m<sup>2</sup> of UV. G1/G2 denotes a mixture of cells that were in either G0/G1 or G2/M at the time of irradiation (see Section 3). Indeed, at 5 J/m<sup>2</sup> of UV, G2/M cells divide relatively rapidly and mix with cells initially in G1, and therefore cannot be analyzed separately. For GM01652B, at 5 J/m<sup>2</sup>, repair cannot be monitored at 24h post-UV since a proportion of cells in S phase at the time of irradiation (S') have traversed G2 and undergone division. Shown is the mean ± SEM of three independent experiments.

syndrome-cells if the formation of blocked replication forks post-UV is either prevented or substantially reduced, i.e., following, respectively, pharmacological inhibition of DNA synthesis prior to UV irradiation, or exposure to a relatively low UV dose ( $5\text{J}/\text{m}^2$ ). Although wavelengths within the UV-C region (190–280 nm) are vastly attenuated at the surface of the earth by stratospheric ozone, we note that  $15\text{J}/\text{m}^2$  of 254-nm UV has been shown to generate a yield of DNA photoproducts comparable to that induced following 1–2 h irradiation with natural sunlight [38,39]. As such it is possible that our results in cultured cells could harbour implications for XPV pathogenesis. As emphasized earlier, the extreme UV-hypermotability leading to skin cancer development in XPV patients is clearly attributable to defective TLS. Specifically, in the absence of pol $\eta$ , XPV cells are able to recruit the activities of pol $\kappa$  and pol $\iota$  which (in cooperation with the B-family DNA polymerase  $\zeta$ ) can efficiently bypass CPDs thereby promoting cell survival; however in doing so these “backup” polymerases, each being orders of magnitude more error-prone than pol $\eta$  when replicating UV-damaged templates, generate excessive errors of nucleotide incorporation [19]. Therefore in instances where XPV patients would sustain high enough doses of natural sunlight (i.e., which induce levels of DNA damage equivalent to or greater than  $15\text{J}/\text{m}^2$  of 254-nm UV), we speculate that defective SPR of highly promutagenic CPDs may to some extent promote XPV-associated hypermutability by acting synergistically with pol $\kappa/\iota$ -mediated highly error-prone TLS past these photoproducts. We further speculate, again in response to high enough doses of natural sunlight, that the incapacity to remove replication-blocking CPDs and 6–4PPs during S phase might partially contribute to the characteristic DNA synthesis defect in XPV. This contribution would be in addition to the primary one provided by deficient pol $\eta$ -mediated CPD bypass; indeed delayed replication restart has been observed in XPV cells irradiated with doses as low as  $2\text{J}/\text{m}^2$  [40], where defective SPR is not expected to occur.

It should be noted that two previous studies (mentioned in the Introduction) used a sensitive radioimmunoassay to probe the possibility that GG-NER of 6–4PPs might be regulated as a function of cell cycle in XPV strains. Firstly EBV-transformed XPV B-lymphocytes (strain XPPHBE), synchronized by centrifugal elutriation and treated with  $12\text{J}/\text{m}^2$  of UV, displayed no differences in repair efficiency during S phase relative to G0/G1 or G2/M [9]. The divergence here with our results may partially reflect the purity of the S phase populations analyzed, i.e., 60% in the aforementioned study compared with essentially 100% in our case. Furthermore whereas it was later shown that XPPHBE bears a frameshift mutation in one *POLH* allele, no sequence alterations were detected in the other allele which was also found to be expressed at only 20% the level of the mutated counterpart [41]. Thus XPPHBE may express some wild-type pol $\eta$  which could significantly enhance SPR. Secondly, another major investigation on XPV-skin fibroblasts irradiated with  $6\text{J}/\text{m}^2$  of UV also failed to observe any cell cycle-specific differences in GG-NER efficiency [13]. This discrepancy may be readily reconciled by our finding here that defective SPR in XPV cells is clearly observed at  $15\text{J}/\text{m}^2$  of UV, but is considerably less pronounced at lower doses in the range of  $5\text{J}/\text{m}^2$ .

It is becoming increasingly apparent that various Y-family polymerases can mediate cellular processes other than TLS [42,43]. Of particular interest here it was unexpectedly shown that pol $\kappa$ -null murine embryonic fibroblasts are defective in the DNA repair synthesis step of NER (although not in an S phase-specific manner) [44]. While a similar role for pol $\eta$  in DNA repair synthesis during S phase cannot be categorically ruled out, we are nonetheless confident that loss of SPR capacity in XPV fibroblasts is attributable to a defect in some step of GG-NER which precedes gapfilling (i.e., in lesion recognition or -incision/excision). Indeed our flow

cytometry-based repair assay specifically measures the complete removal (excision) of UV DNA photoproducts, and would not complementarily reveal defects in DNA repair synthesis *per se*, i.e., assuming that this latter step is carried out largely or entirely post-excision as has been proposed [45–47].

How then might loss of functional pol $\eta$  engender virtually complete loss of SPR, while exerting no effect on repair during G0/G1 or G2/M? We recently reported that ATR-deficient Seckel syndrome fibroblasts, like XPV fibroblasts, exhibit a significant S phase-specific GG-NER defect [20]. Following UV exposure, ATR rapidly phosphorylates a multitude of substrates that together stabilize stalled replication forks and facilitate DNA synthesis restart [48]. As such deficiency in ATR signaling causes abnormal persistence and eventual collapse of blocked replication forks, leading to induction of highly genotoxic DSBs at sites of UV-damage [49]. Moreover enhanced H2AX phosphorylation has been noted in XPV vs. normal cells post-UV, indicating that the former also suffer a relative increase in DSB formation at collapsed replication forks [50,51]. Finally our results in either XPV- or Seckel syndrome-cells treated with DNA synthesis inhibitors or low dose UV suggest that defective SPR can be fully rescued by precluding, or substantially reducing below some threshold, the formation of blocked replication forks at UV-adducted sites in DNA.

Considering the above commonalities between XPV- and Seckel syndrome-cells we speculate that, in general, attenuation of GG-NER may actually serve to promote cellular survival specifically in S phase populations undergoing excessive replication stress. We emphasize that such a mechanism may not depend upon any direct enzymatic role in GG-NER for either ATR or pol $\eta$ , but rather solely upon the ability of these proteins to mitigate replication stress which in turn positively influences repair. Precisely how this occurs remains to be established. It should be noted that higher levels of replication stress engender corresponding increases in large tracts of single-strand DNA due to functional uncoupling of DNA synthetic enzymes at stalled replication forks; furthermore replication protein-A (RP-A) avidly binds to such tracts, an event that is required for activation of ATR signaling [52]. It is therefore conceivable and consistent with our data that, once levels of replication stress reach a particular threshold, RP-A becomes effectively sequestered. This may abrogate removal of UV-induced DNA damage in the genome overall (exclusively in replicating cells), as sufficient levels of free RP-A are required to carry out the pre-incision and gapfilling steps of GG-NER [53]. This hypothetical model has received some experimental support in the case of yeast during meiosis, where the existence of excess single-stranded DNA appears to reduce the efficiency of double-strand-break repair through RP-A sequestration [54]. Further support is provided by the very recent demonstration that XPV cells are subject to elevated levels of fork stalling that correlates with the generation of extensive ssDNA regions (which are ostensibly bound by RP-A) [55]. Finally we note that in addition to the above passive mechanism based on RP-A sequestration, considering the status of stalled replication forks *per se* as powerful signals for initiating various mechanisms of self-stabilization, we speculate that genome-wide inhibition of GG-NER during S phase might somehow be actively regulated.

Whatever the precise mechanistic underpinnings, a significant reduction in “unwanted” NER-mediated DNA incisions under conditions of excessive replication stress may actually serve to promote cellular survival by forestalling the “conversion” of numerous CPDs and 6–4PPs located at persistently stalled replication forks into considerably more lethal DSBs [56]. In the case of XPV cells, such a reduction of DSB formation may be needed to facilitate alternative pathways, e.g., error-free template switching [57], and/or error-prone bypass using backup TLS polymerases [19], designed to resolve blocked replication forks and stimulate the resumption

of DNA synthesis as rapidly as possible. However, while ablation of SPR in XPV patients might be considered potentially "beneficial" at the cellular level by increasing survival, the accompanying effect at the organismal level, i.e., remarkably elevated levels of sunlight-induced mutation and cancer, is of course disastrous.

### Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Acknowledgements

This work was supported by an operating grant awarded to E.A.D. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and to S.C. by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). J.M.B. is supported by an NSERC doctoral research award. The authors are grateful to Drs. El Bachir Affar, Dindial Ramotar, and James Daley for critical reading of the manuscript.

### References

- [1] E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, R.D. Wood, R.A. Schultz, T. Ellenberger (Eds.), *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, 2006.
- [2] L.C. Gillet, O.D. Schärer, Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair, *Chem. Rev.* 106 (2006) 253–276.
- [3] P.C. Hanawalt, G. Spivak, Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 958–970.
- [4] J.E. Cleaver, Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum, *Nature* 218 (1968) 652–656.
- [5] K.H. Kraemer, M.M. Lee, J. Scotto, DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum, *Carcinogenesis* 5 (1984) 511–514.
- [6] J.E. Cleaver, Xeroderma pigmentosum: variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light, *J. Invest. Dermatol.* 58 (1972) 124–128.
- [7] J.H. Robbins, W.R. Lewis, A.E. Miller, Xeroderma pigmentosum epidermal cells with normal UV-induced thymidine incorporation, *J. Invest. Dermatol.* 59 (1972) 402–408.
- [8] W.J. Kleijer, E.A. de Weerd-Kastelein, M.L. Shuyter, W. Keijzer, J. de Wit, D. Bootsma, UV-induced DNA repair synthesis in cells of patients with different forms of xeroderma pigmentosum and of heterozygotes, *Mutat. Res.* 20 (1973) 417–428.
- [9] D.L. Mitchell, J.E. Cleaver, M.P. Lowery, R.R. Hewitt, Induction and repair of (6–4) photoproducts in normal human and xeroderma pigmentosum variant cells during the cell cycle, *Mutat. Res.* 337 (1995) 161–167.
- [10] T. Hiramoto, T. Matsunaga, M. Ichihashi, O. Nikaido, Y. Fujiwara, Y. Mishima, Repair of 254 nm ultraviolet-induced (6–4) photoproducts: monoclonal antibody recognition and differential defects in xeroderma pigmentosum complementation groups A, D, and variant, *J. Invest. Dermatol.* 93 (1989) 703–706.
- [11] D.L. Mitchell, C.A. Haipek, J.M. Clarkson, Xeroderma pigmentosum variant cells are not defective in the repair of (6–4) photoproducts, *Int. J. Radiat. Biol.* 52 (1987) 201–205.
- [12] A. Hessel, R.J. Siegle, D.L. Mitchell, J.E. Cleaver, Xeroderma pigmentosum variant with multisystem involvement, *Arch. Dermatol.* 128 (1992) 1233–1237.
- [13] Y.C. Wang, V.M. Maher, D.L. Mitchell, J.J. McCormick, Evidence from mutation spectra that the UV hypermutability of xeroderma pigmentosum variant cells reflects abnormal, error-prone replication on a template containing photoproducts, *Mol. Cell Biol.* 13 (1993) 4276–4283.
- [14] V.M. Maher, L.M. Ouellette, R.D. Curran, J.J. McCormick, Frequency of ultraviolet light-induced mutations is higher in xeroderma pigmentosum variant cells than in normal human cells, *Nature* 261 (1976) 593–595.
- [15] A.R. Lehmann, S. Kirk-Bell, C.F. Arlett, M.C. Paterson, P.H. Lohman, E.A. de Weerd-Kastelein, D. Bootsma, Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 (1975) 219–223.
- [16] C. Masutani, R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio, F. Hanaoka, The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase  $\epsilon$ , *Nature* 399 (1999) 700–704.
- [17] S.D. McCulloch, T.A. Kunkel, The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases, *Cell Res.* 18 (2008) 148–161.
- [18] S.L. Yu, R.E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, Requirement of DNA polymerase  $\epsilon$  for error-free bypass of UV-induced CC and TC photoproducts, *Mol. Cell Biol.* 21 (2001) 185–188.
- [19] O. Ziv, N. Geacintov, S. Nakajima, A. Yasui, Z. Livneh, DNA polymerase  $\zeta$  cooperates with polymerases  $\kappa$  and  $\iota$  in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 11552–11557.
- [20] Y. Auclair, R. Rouget, E.B. Affar, E.A. Drobetsky, ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 17896–17901.
- [21] R. Rouget, Y. Auclair, M. Loignon, E.B. Affar, E.A. Drobetsky, A sensitive flow cytometry-based nucleotide excision repair assay unexpectedly reveals that mitogen-activated protein kinase signalling does not regulate the removal of UV-induced DNA damage in human cells, *J. Biol. Chem.* 283 (2007) 5533–5541.
- [22] R.R. Lapos, L. Feeney, J.E. Cleaver, Recapitulation of the cellular xeroderma pigmentosum-variant phenotypes using short interfering RNA for DNA polymerase  $\epsilon$ , *Cancer Res.* 63 (2003) 3909–3912.
- [23] M. Thakur, M. Wernick, C. Collins, C.L. Limoli, E. Crowley, J.E. Cleaver, DNA polymerase  $\epsilon$  undergoes alternative splicing, protects against UV sensitivity and apoptosis, and suppresses Mre11-dependent recombination, *Genes Chromosomes Cancer* 32 (2001) 222–235.
- [24] N. Otsu, A threshold selection method from gray-level histograms, *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* 9 (1979) 62–66.
- [25] C.F. Arlett, S.A. Harcourt, B.C. Broughton, The influence of caffeine on cell survival in excision-proficient and excision-deficient xeroderma pigmentosum and normal human cell strains following ultraviolet-irradiation, *Mutat. Res.* 33 (1975) 341–346.
- [26] D.L. Mitchell, C.A. Haipek, J.M. Clarkson, (6–4) Photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimers, *Mutat. Res.* 143 (1985) 109–112.
- [27] V.O. Melnikova, H.N. Ananthaswamy, Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer, *Mutat. Res.* 571 (2005) 91–106.
- [28] S. Adimoolam, C.X. Lin, J.M. Ford, The p53-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 (cip1, waf1, sdi1), is not required for global genomic and transcription-coupled nucleotide excision repair of UV-induced DNA photoproducts, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 25813–25822.
- [29] J. Tang, G. Chu, Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein, *DNA Repair* 1 (2002) 601–616.
- [30] A.R. Lehmann, S. Kirk-Bell, C.F. Arlett, S.A. Harcourt, E.A. de Weerd-Kastelein, W. Keijzer, P. Hall-Smith, Repair of ultraviolet light damage in a variety of human fibroblast cell strains, *Cancer Res.* 37 (1977) 904–910.
- [31] R.B. Painter, Inhibition and recovery of DNA synthesis in human cells after exposure to ultraviolet light, *Mutat. Res.* 145 (1985) 63–69.
- [32] P. Kannouche, B.C. Broughton, M. Volker, F. Hanaoka, L.H. Mullenders, A.R. Lehmann, Domain structure, localization, and function of DNA polymerase  $\epsilon$ , defective in xeroderma pigmentosum variant cells, *Genes Dev.* 15 (2001) 158–172.
- [33] A. Stary, P. Kannouche, A.R. Lehmann, A. Sarasin, Role of DNA polymerase  $\epsilon$  in the UV mutation spectrum in human cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 18767–18775.
- [34] N. Acharya, J.H. Yoon, H. Gali, I. Unk, L. Haracska, R.E. Johnson, J. Hurwitz, L. Prakash, S. Prakash, Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase  $\epsilon$  in translesion DNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 17724–17729.
- [35] G. Pedrali-Noy, S. Spadari, A. Miller-Faures, A.O. Miller, J. Kruppa, G. Koch, Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase  $\alpha$  with aphidicolin, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 377–387.
- [36] J.A. Wright, A.K. Chan, B.K. Choy, R.A. Hurta, G.A. McClarty, A.Y. Tagger, Regulation and drug resistance mechanisms of mammalian ribonucleotide reductase, and the significance to DNA synthesis, *Biochem. Cell Biol.* 68 (1990) 1364–1371.
- [37] R. Greinert, O. Boguhn, D. Harder, E.W. Breitbart, D.L. Mitchell, B. Volkmer, The dose dependence of cyclobutane dimer induction and repair in UVB-irradiated human keratinocytes, *Photochem. Photobiol.* 72 (2000) 701–708.
- [38] Z. Kuluncsics, D. Perdiz, E. Brulay, B. Muel, E. Sage, Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts, *J. Photochem. Photobiol.* 49 (1999) 71–80.
- [39] J.H. Yoon, C.S. Lee, T.R. O'Connor, A. Yasui, G.P. Pfeifer, The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight, *J. Mol. Biol.* 299 (2000) 681–693.
- [40] S.K. Bullock, W.K. Kaufmann, M. Cordeiro-Stone, Enhanced S phase delay and inhibition of replication of an undamaged shuttle vector in UVC-irradiated xeroderma pigmentosum variant, *Carcinogenesis* 22 (2001) 233–241.
- [41] R.E. Johnson, C.M. Kondratik, S. Prakash, L. Prakash, hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum, *Science* 285 (1999) 263–265.
- [42] A.R. Lehmann, New functions for Y family polymerases, *Mol. Cell* 24 (2006) 493–495.
- [43] L. Rey, J.M. Sidorova, N. Puget, F. Boudsocq, D.S. Biard, R.J. Monnat Jr., C. Cazaux, J.S. Hoffmann, Human DNA polymerase  $\epsilon$  is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication, *Mol. Cell Biol.* (2009).
- [44] T. Ogi, A.R. Lehmann, The Y-family DNA polymerase  $\kappa$  (pol  $\kappa$ ) functions in mammalian nucleotide-excision repair, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 640–642.
- [45] D. Mu, M. Wakasugi, D.S. Hsu, A. Sancar, Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 28971–28979.
- [46] J.G. Moggs, K.J. Yarema, J.M. Essigmann, R.D. Wood, Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 7177–7186.
- [47] L. Staresinic, A.F. Fagbemi, J.H. Enzlin, A.M. Gourdin, N. Wijgers, I. Dunand-Sauthier, G. Giglia-Mari, S.G. Clarkson, W. Vermeulen, O.D. Schärer, Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair, *EMBO J.* 28 (2009) 1111–1120.
- [48] K.A. Cimprich, D. Cortez, ATR: an essential regulator of genome integrity, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 616–627.
- [49] A.M. Friedel, B.L. Pike, S.M. Gasser, ATR/Mec1: coordinating fork stability and repair, *Curr. Opin. Cell Biol.* 21 (2009) 237–244.

# **ARTICLE 3**

# ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells

Yannick Auclair, Raphael Rouget, El Bachir Affar, and Elliot A. Drobetsky<sup>1</sup>

Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, Canada

Edited by Richard B. Setlow, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY, and approved September 25, 2008 (received for review February 19, 2008)

**Global-genomic nucleotide excision repair (GG-NER) is the only pathway available to humans for removal, from the genome overall, of highly genotoxic helix-distorting DNA adducts generated by many environmental mutagens and certain chemotherapeutic agents, e.g., UV-induced 6–4 photoproducts (6–4PPs) and cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs). The ataxia telangiectasia and rad-3-related kinase (ATR) is rapidly activated in response to UV-induced replication stress and proceeds to phosphorylate a plethora of downstream effectors that modulate primarily cell cycle checkpoints but also apoptosis and DNA repair. To investigate whether this critical kinase might participate in the regulation of GG-NER, we developed a novel flow cytometry-based DNA repair assay that allows precise evaluation of GG-NER kinetics as a function of cell cycle. Remarkably, inhibition of ATR signaling in primary human lung fibroblasts by treatment with caffeine, or with siRNA specifically targeting ATR, resulted in total inhibition of 6–4PP removal during S phase, whereas cells repaired normally during either G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>/M. Similarly striking S-phase-specific defects in GG-NER of both 6–4PPs and CPDs were documented in ATR-deficient Seckel syndrome skin fibroblasts. Finally, among six diverse model human tumor strains investigated, three manifested complete abrogation of 6–4PP repair exclusively in S-phase populations. Our data reveal a highly novel role for ATR in the regulation of GG-NER uniquely during S phase of the cell cycle, and indicate that many human cancers may be characterized by a defect in this regulation.**

cell cycle | flow cytometry | nucleotide excision repair | UV-induced DNA photoproducts

**N**ucleotide excision repair (NER) forestalls neoplastic transformation by removing an array of helix-distorting, replication-blocking DNA adducts generated by a multitude of environmental carcinogens, as well as by certain widely used chemotherapeutic drugs. These so-called “bulky DNA lesions” include ultraviolet (UV)-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and 6–4 photoproducts (6–4PPs), which play key roles in the pathogenesis of sunlight-induced skin cancer (1) and constitute ideal model DNA lesions for dissecting the mechanism of NER. The clinical relevance of NER is highlighted by patients afflicted with *Xeroderma pigmentosum* who carry inactivating mutations in specific NER pathway genes, are defective in the removal of bulky DNA adducts, and display striking predisposition to cutaneous tumor development (2).

NER is comprised of two overlapping subpathways. Global genomic NER (GG-NER) removes DNA damage from anywhere within the nuclear genome, and is initiated when the UV-DDB1/UV-DDB2 and then XPC/HR23B heterodimers recognize the helical distortion introduced into DNA by bulky adducts and bind to the damaged site (3). The “core NER pathway” is then recruited and removes the lesion through sequential steps of strand unwinding, incision in a number of bases on either side of the lesion, excision of the lesion as part of a short single-stranded oligonucleotide, and filling in of the resultant gap using semiconservative DNA replication factors

and the nondamaged complementary strand as template. The other NER subpathway, transcription-coupled NER, removes bulky DNA adducts exclusively from the transcribed strand of active genes (4). This subpathway differs from GG-NER only in the manner of lesion recognition, i.e., it is triggered by blockage of RNA polymerase II at adducted sites along the transcribed strand. This is followed by binding of the CS-A and CS-B proteins and recruitment of the core NER pathway, which then, in the identical manner as GG-NER, completely restores the integrity of the DNA.

After treatment with the model mutagen 254-nm UV (hereafter designated UV) or other replication stress-inducing agents, the ataxia-telangiectasia and rad3-related kinase (ATR) is rapidly activated (5), and in turn phosphorylates the p53 tumor suppressor thereby contributing to the latter’s stabilization and function (6). In addition, previous reports have demonstrated that for most UV-exposed cell types, p53 is required for efficient repair of CPDs via GG-NER (7, 8). However the situation for 6–4PPs remains less clear with various studies showing that loss of p53 reduces (9–11) or has no influence (12, 13) on removal of this photoproduct. In any case it is conceivable *a priori* that ATR regulates p53-dependent GG-NER; moreover this kinase may also be expected to participate in GG-NER independently of p53. Indeed, during replication stress, ATR phosphorylates a multitude of substrates aside from p53 that modulate primarily cell cycle checkpoints but also apoptosis and DNA repair, including various proteins implicated in GG-NER (see Discussion). Despite this, no previous studies to our knowledge have thoroughly directly evaluated GG-NER kinetics in cultured human cells after abrogation of ATR signaling.

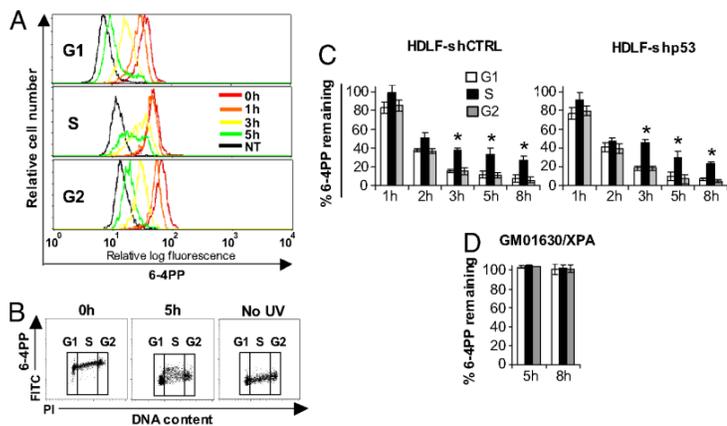
Here we explore the possibility that ATR regulates GG-NER, possibly in an S-phase-specific manner given the preeminent role of this kinase in safeguarding semiconservative DNA replication during genotoxic stress. In a novel approach, a flow cytometry-based assay recently developed (14) was optimized to precisely evaluate the kinetics of UV DNA photoproduct repair as a function of cell cycle. We were able to conclusively demonstrate that during S, but not G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>/M, removal of UV-induced DNA damage via GG-NER in human cells is strictly dependent upon ATR, revealing a highly novel function for this kinase in the maintenance of genomic stability. Moreover we show that among six model human tumor strains investigated, three exhibit complete deficiency in GG-NER exclusively during S phase, implying

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0801585105/DCSupplemental](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0801585105/DCSupplemental).

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA



**Fig. 1.** GG-NER of 6-4PPs in individual phases of the cell cycle in HDLFs. (A) Representative histogram overlay illustrating repair of 6-4PPs in each phase of the cell cycle in HDLF-shCTRL. (B) Bivariate distributions of 6-4PP (FITC; log scale) versus DNA content (PI; linear scale) in HDLF-shCTRL. (C) Graphical depictions of 6-4PP removal in HDLFs differing in p53 status and (D), in XPA-deficient HDSFs. Mean  $\pm$  SEM from three independent experiments is shown. \*,  $P < 0.05$ ; two-tailed paired  $t$  test (S phase relative to  $G_1$ ).

that a similar cell-cycle-specific repair defect may be present in many human cancers.

## Results

**Optimization of a Flow-Cytometry-Based Assay to Quantify DNA Photoproduct Removal in Individual Phases of the Cell Cycle.** We recently reported on the development of a flow cytometry-based fluorescence assay permitting evaluation of GG-NER kinetics in UV-exposed cells stained with anti-CPD or anti-6-4PP antibodies (14). During the course of this investigation, before UV exposure, cellular proliferation was abolished by growth to confluence or serum starvation (synchronization in  $G_0/G_1$ ). Such an approach has traditionally been taken to ensure accurate determination of GG-NER kinetics, which requires that newly replicated (nondamaged) DNA generated during post-UV incubations be either rigorously controlled for or excluded from consideration. In fact, a considerable majority of previous studies using various direct assays for monitoring UV DNA photoproduct removal was performed under conditions in which S-phase DNA had been eliminated from the analysis.

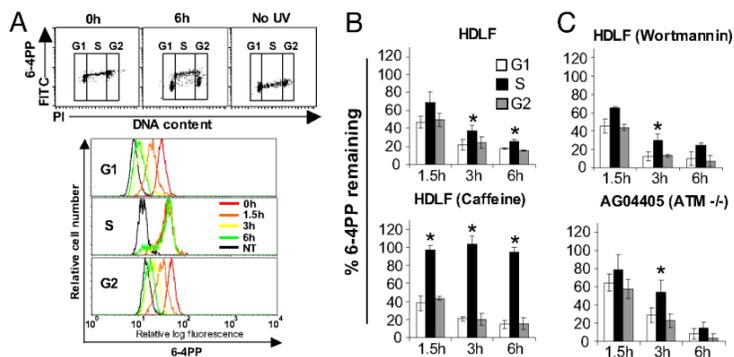
In the present case, we were interested in evaluating whether GG-NER might be regulated by ATR as a function of cell cycle, and thus proceeded to optimize our assay such that DNA photoproduct removal could be precisely monitored in each of  $G_0/G_1$ , S, and  $G_2/M$ . For this initial purpose we chose as experimental model isogenic primary human lung fibroblast (HDLF) strains stably expressing either an shRNA targeting p53 (HDLF-shp53) or a scrambled shRNA sequence (HDLF-shCTRL). As expected, p53 was strongly expressed in HDLF-shCTRL at 6 h post-UV, but only barely detectable in the shp53-expressing counterpart [supporting information (SI) Fig. S1A].

As a critical control, HDLF-shCTRL cells were first irradiated with  $25 \text{ J/m}^2$  or mock irradiated, followed immediately by incubation with the mitotic inhibitor nocodazole to block re-entry of cells from  $G_2/M$  to  $G_0/G_1$ . Flow-cytometric analysis of propidium iodide (PI)-stained cells (15) then revealed, as fully expected, that most of the nocodazole-treated, mock-irradiated HDLF-shCTRL cells had accumulated in  $G_2/M$  at 24 h (Fig. S1B). However, consistent with the well-characterized ability of UV to induce transient growth arrest throughout the cell cycle, no significant progression was observed within 24 h post-UV.

Very similar results were obtained for HDLF-shp53 treated with nocodazole with or without UV (data not shown). We thus concluded that for HDLFs irradiated with  $25 \text{ J/m}^2$  UV, GG-NER kinetics could be accurately measured in individual phases of the cell cycle within the first 24 h without any need to control for cellular proliferation. This permitted us to use our flow cytometry-based repair assay precisely as described (14), except that in the present circumstance exponentially growing, asynchronous (rather than  $G_0/G_1$ -synchronized) cells were UV irradiated followed by determination of repair kinetics for populations gated in each of  $G_0/G_1$ , S, and  $G_2/M$ .

Here we have focused primarily on 6-4PPs, which are repaired via GG-NER much more rapidly than CPDs, i.e., generally 80–100% removal within 6–8 h post-UV for 6-4PPs, and 30–60% removal at 24 h post-UV for CPDs (16). A representative histogram overlay, depicting the kinetics of 6-4PP repair in each of  $G_0/G_1$ , S, or  $G_2/M$  for UV-exposed HDLF-shCTRL cells, is shown (Fig. 1A). In each phase, most markedly S, the increased width of peaks with time indicates heterogeneity for repair within the population, a phenomenon that is visually apparent in the representative dot plot (Fig. 1B). As shown in Fig. 1C, on average 80–95% of 6-4PPs are removed in HDLF-shCTRL by 3–5 h post-UV during  $G_0/G_1$  or  $G_2/M$ , whereas repair efficiency is moderately but significantly diminished during S (60–75% removal). Of note, HDLF-shp53 exhibited very similar kinetics of 6-4PP removal relative to HDLF-shCTRL, strongly supporting the notion that p53 generally is not required for GG-NER of this photoproduct in human cells. As negative control, NER-deficient primary skin fibroblasts, derived from an XPA patient, were confirmed to be completely defective in 6-4PP repair during all phases of the cell cycle (Fig. 1D).

**Abrogation of Signaling Through ATR, but Not Through ATM, Completely Abolishes 6-4PP Repair Exclusively During S Phase.** To initially evaluate whether ATR might regulate GG-NER, HDLFs were pretreated with 10 mmol/l caffeine, which strongly inhibits ATR signaling (17). We demonstrated by immunofluorescence microscopy that, in the manner expected (18), caffeine treatment abrogated ATR-mediated phosphorylation of H2AX after UV (Fig. S2A). As depicted in the representative profiles and accompanying histogram (Fig. 2A and B), strikingly, 10 mmol/l caffeine completely abolished 6-4PP repair during S, whereas



**Fig. 2.** Pharmacological abrogation of signaling through ATR but not through ATM completely abolishes GG-NER of 6-4PPs in HDLFs during S but not during G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>/M. (A) Representative results depicting cell cycle-specific 6-4PP repair in HDLFs treated with 10 mmol/l of caffeine; (top panel) Bivariate distributions of 6-4PP (FITC) versus DNA content (PI); (bottom panel) representative histogram overlay illustrating repair of 6-4PP. (B) Graphical depiction of 6-4PP repair in wild-type HDLFs treated or not with 10 mmol/l caffeine followed by irradiation with UV. (C) Graphical depictions of 6-4PP repair in wild-type HDLFs treated with 30 μmol/l wortmannin, and in the ATM-deficient cell line AG04405A, following irradiation with UV. Mean ± SEM from three independent experiments is shown. \*, *P* < 0.05; two-tailed paired *t* test (S phase relative to G<sub>1</sub>).

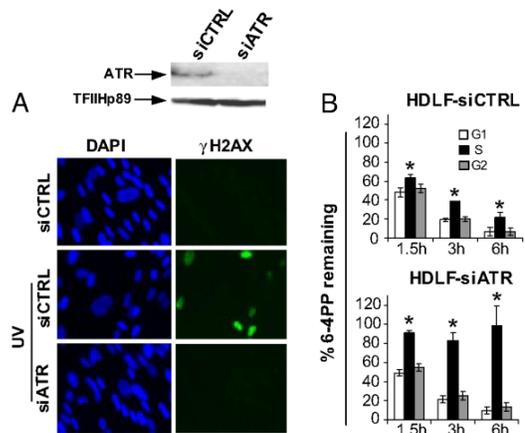
repair was efficient during G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>/M. Because the efficiency of UV DNA photoproduct repair can vary significantly as a function of dose (19), we also investigated 6-4PP repair in HDLFs with or without caffeine after irradiation with 10 J/m<sup>2</sup>. At this dose, repair efficiency was consistently lower during S relative to the other phases (Fig. S3A) although unlike for 25 J/m<sup>2</sup> this reduction was not statistically significant. Importantly however, in accordance with the findings for 25 J/m<sup>2</sup>, caffeine treatment profoundly abrogated GG-NER of 6-4PPs exclusively during S phase in HDLFs irradiated with 10 J/m<sup>2</sup> (Fig. S3B).

Although the above data suggest that ATR might regulate GG-NER uniquely during S phase, the participation of other PI3 kinases known to be caffeine sensitive cannot be ruled out. In particular, the ataxia telangiectasia-mutated kinase (ATM) is strongly inhibited by 10 mmol/l caffeine; moreover ATM was recently shown to be phosphorylated after UV and has previously been implicated in NER (see Discussion). HDLFs were thus cultured in the presence of 30 μmol/l wortmannin, which inhibits signaling through ATM but not ATR (20). Moreover this treatment, as expected (21), abrogated phosphorylation of H2AX after exposure to IR but not UV (Fig. S2A,B). We found that these wortmannin-treated HDLFs, as well as primary skin fibroblasts derived from an ATM-deficient patient, carried out relatively efficient repair of 6-4PPs in all phases of the cell cycle (Fig. 2C).

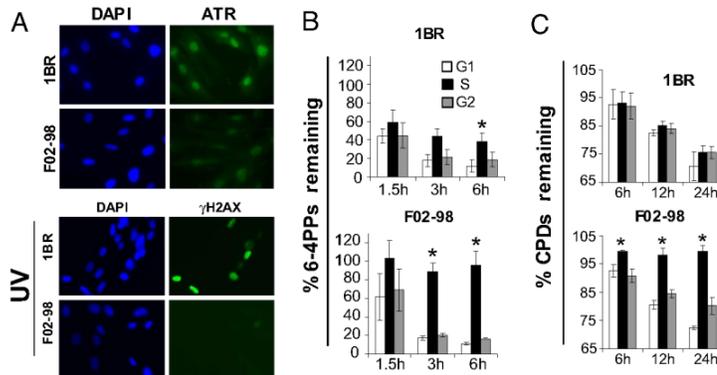
To unequivocally confirm a role for ATR in S-phase-specific GG-NER, HDLFs were transiently transfected with an siRNA pool targeting this kinase, which resulted in ≈90% reduction of ATR protein levels as measured by densitometry (Fig. 3A, top panel). Moreover immunofluorescence microscopy demonstrated that ATR-dependent phosphorylation of H2AX was abrogated after UV in siATR-treated HDLFs relative to controls expressing scrambled siRNAs (Fig. 3A, bottom panel). Remarkably, in accord with our results in caffeine-treated cells, Fig. 3B clearly depicts complete abolition of 6-4PP removal in siATR-HDLFs during S phase, whereas repair during G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>/M is not affected. On the other hand, repair rates appeared normal in all phases in control HDLFs. The above data, taken together, conclusively demonstrate the existence of a highly novel ATR-dependent regulation of GG-NER operating exclusively during S phase in human cells.

**ATR-Deficient Seckel Syndrome Skin Fibroblasts Are Profoundly Defective in S-Phase-Specific GG-NER of 6-4PPs and CPDs.** We next analyzed the kinetics of 6-4PP removal in the ATR-deficient

Seckel syndrome skin fibroblast strain F02-98 following UV. Relative to the closely related wild-type counterpart 1BR, F02-98 exhibited profoundly reduced levels of ATR protein expression, and of H2AX phosphorylation after UV (Fig. 4A). Furthermore, as for HDLFs, cell cycle progression in 1BR and F02-98 was abolished for at least 24 h post UV (data not shown). Consistent with the striking results in Figs. 2 and 3, F02-98 exhibited complete abrogation of 6-4PP removal uniquely during S whereas 1BR repaired normally (Fig. 4B). GG-NER of CPDs was also evaluated in the above paired strains. At 12 and 24 h post-UV ≈15% and 25% of CPDs, respectively, were removed with similar efficiency in all phases of the cell cycle in 1BR. (In contrast with the situation for 6-4PPs in HDLFs, no apparent slowdown of CPD repair during S phase was noted in



**Fig. 3.** ATR is strictly required for GG-NER of 6-4PPs exclusively during S phase of the cell cycle in HDLFs. (A) Western blot showing expression of ATR (top panel) and immunostaining of γH2AX (bottom panel), 2 hours after irradiation with UV in HDLFs transfected with control siRNAs versus siRNAs targeting ATR. (B) Graphical depictions of 6-4PP repair in HDLFs transfected with control siRNAs or with siRNAs targeting ATR and irradiated with UV. Mean ± SEM from three independent experiments is shown. \*, *P* < 0.05; two-tailed paired *t* test (S phase relative to G<sub>1</sub>).



**Fig. 4.** Removal of UV-induced DNA photoproducts is abrogated uniquely during S phase in ATR-deficient Seckel syndrome skin fibroblasts. (A) Immunostaining of ATR protein (top panel) and of  $\gamma$ H2AX (bottom panel) 2 hours post-UV in Seckel syndrome F02-98 skin fibroblasts versus the closely related normal counterpart 1BR. (B) Graphical depiction of 6-4PP repair and (C) of CPD repair, in F02-98 versus 1BR. Mean  $\pm$  SEM from three independent experiments is shown. \*,  $P < 0.05$ ; two-tailed paired  $t$  test (S phase relative to G<sub>1</sub>).

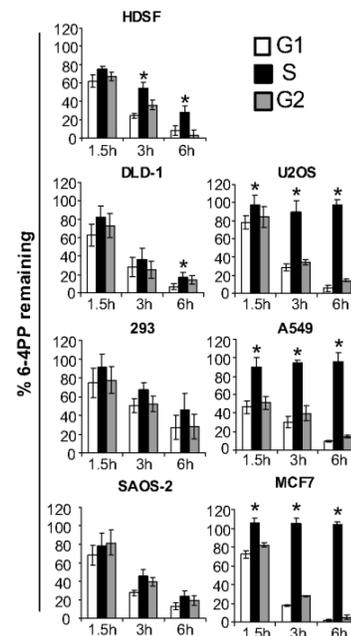
1BR.) On the other hand, although F02-98 manifested similar CPD removal rates during G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>/M, repair was totally abolished during S at all time points (Fig. 4C). These data indicate that removal of CPDs, as well as of 6-4PPs, is strictly regulated in an ATR-dependent manner uniquely during S phase.

**GG-NER of 6-4PPs Is Abolished During S Phase in Diverse Model Tumor Cell Lines.** Having evaluated cell cycle specificity for GG-NER of 6-4PPs in various human fibroblast strains differing in p53, ATR, or ATM status, we turned our attention to cancer cells. Repair of 6-4PP was investigated in six model tumorigenic strains, i.e., U2OS osteosarcoma, 293 embryonic kidney, DLD-1 colorectal carcinoma, SAOS-2 osteosarcoma, A549 lung carcinoma, and MCF-7 breast carcinoma. Primary human skin fibroblasts (HDSFs) were also investigated as control. For each of the tumor strains, flow-cytometric analysis of PI-stained cells showed that cell cycle progression was abolished within the first 6 h post-UV after exposure to 25 J/m<sup>2</sup> (data not shown). For HDSFs, in accord with the situation for HDLFs, up to 75% and 95% of 6-4PP were removed by 3 h and 6 h post-UV, respectively, in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>/M, whereas during S these values were significantly reduced, i.e., were only 40% and 75% (Fig. 5). The combined data in primary HDSFs and HDLFs suggest that nonimmortalized strains can exhibit modest but significant reductions in the efficiency of 6-4PP removal during S relative to G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>/M under normal culture conditions. Strikingly, however, three tumor strains, i.e., A549, MCF-7, and U2OS, exhibited complete abrogation of 6-4PP repair exclusively during S (Fig. 5). On the other hand, in the case of DLD-1, SAOS-2, and 293, 6-4PP removal was rapid and equivalent during all phases. Of note, the three tumor strains deficient in 6-4PP removal during S express ATR protein and are proficient in phosphorylation of H2AX after UV (Fig. S4). Moreover these latter three strains are all known to be p53-proficient, whereas those exhibiting no differences in repair among the cell cycle phases have been characterized as p53 deficient.

**Discussion**

Here we report on the development and use of a novel flow-cytometry-based assay that allows precise determination of GG-NER kinetics as a function of cell cycle. In initially investigating UV-irradiated cells under normal culture conditions, we showed that removal of 6-4PPs in HDLFs or HDSFs irradiated

with 25 J/m<sup>2</sup> UV was moderately but significantly slower during S relative to G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>/M. This S-phase-specific reduction in GG-NER efficiency in primary fibroblasts may not be actively regulated, but rather could reflect, for example, differences among the cell cycle phases with respect to chromatin structure or other determinants affecting access of repair proteins to sites of DNA damage. In any case, unlike the situation for primary lung or skin fibroblasts, we observed equivalent repair kinetics during all phases of the cycle for (i) 6-4PPs in three model tumor cell lines, (ii) 6-4PPs in HDLFs treated with 10J/m<sup>2</sup> UV, and (iii)



**Fig. 5.** Cell cycle-specific repair of UV DNA photoproducts in human tumor cell lines. Graphical depictions of 6-4PP repair in HDSFs and in various tumor strains irradiated with 25 J/m<sup>2</sup> of UV. Mean  $\pm$  SEM of three independent experiments is shown. \*,  $P < 0.05$ ; two-tailed paired  $t$  test (S relative to G<sub>1</sub>).

for CPDs in hTERT-immortalized 1BR skin fibroblasts. It should also be emphasized that a few prior studies have evaluated GG-NER rates as a function of cell cycle under normal culture conditions. Of particular relevance here, in contrast with our results, using a well-established RIA it was shown in primary skin fibroblasts (22) or primary lymphoblasts (23) that removal of 6-4PP is not influenced by cell cycle. Other studies also performed in primary fibroblasts or lymphoblasts indicated that GG-NER rates may actually be relatively faster during S or G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, respectively (24, 25). It must be emphasized that the above investigations each used different GG-NER assays and different methods for isolating cell populations in specific phases. The overall data thus indicate that cell-cycle-specific variations in GG-NER efficiency under normal culture conditions might reflect the repair assay, dose, and/or particular DNA adduct studied. We suggest that future investigations using diverse primary and cancer cell types in conjunction with the powerful flow-cytometry-based repair assay described herein could eventually establish a firm consensus regarding this issue.

Having established a method for evaluating GG-NER kinetics as a function of cell cycle, we proceeded to conclusively demonstrate that ATR is strictly required for GG-NER exclusively during S, thereby revealing a highly novel role for this kinase in the maintenance of genomic stability. In addition, our data strongly indicate that ATM is not involved in S-phase-specific regulation of repair. We believe it important to address the potential role of ATM, as this kinase, once widely considered not to be capable of being activated by UV, can in fact become phosphorylated following UV in an ATR-dependent manner (26). Moreover ATM had been shown (*i*) to physically interact with components of the NER machinery after treatment with the UV-mimetic agent cisplatin (27), and (*ii*) to phosphorylate the NER pathway factor RP-A (replication protein-A) in response to UV (28).

The precise ATR substrate(s) that regulate S-phase-specific GG-NER remain(s) to be identified. Our data on 6-4PP repair in HDLFs expressing shRNA targeting p53 (Fig. 1), and in p53-deficient vs. p53-proficient tumor cell strains (Fig. 5), taken together strongly indicate that p53 does not participate in this regulation. However, in response to UV, ATR rapidly phosphorylates a plethora of proteins aside from p53 that regulate primarily cell cycle checkpoints but also apoptosis and DNA repair. Regarding potential ATR substrates that may regulate S-phase-specific repair independently of p53, it is noteworthy that RP-A is phosphorylated on multiple serine/threonine residues by ATR post-UV (29) and plays a central role not only in semiconservative DNA replication but also in both the lesion recognition- and gap filling-steps of GG-NER (30). We also highlight an extensive proteomics analysis recently identifying XPC and XPA as potential ATR substrates during genotoxic stress (31). Furthermore firm experimental evidence was presented showing that XPA is indeed phosphorylated by ATR on serine 196 after UV, and that this event is required for maintaining UV resistance (32). A follow-up investigation demonstrated that redistribution of XPA to the nucleus is also dependent on ATR but, interestingly, not on serine 196 phosphorylation (33).

In addition to the above ATR substrates participating directly in GG-NER, others have been firmly implicated in this pathway. The BRCA1 tumor suppressor is phosphorylated by ATR on multiple serine residues in response to UV (34), and moreover has previously been implicated in p53-independent regulation of GG-NER (35). In addition, the recently identified replication-checkpoint protein claspin is phosphorylated in an ATR-dependent manner after UV (36) and was shown to interact directly with UV-DDB1, UV-DDB2, and XP-C (37). Although this latter study demonstrated that RNAi-mediated knockdown of claspin does not affect GG-NER, repair was not monitored

specifically in S-phase cells. In conclusion, it remains to be evaluated whether loss of ATR-dependent phosphorylation of any among RPA, XPA, XPC, BRCA1, or claspin might abrogate GG-NER in UV-exposed cells during S phase, but not during G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>/M.

The intriguing observation here that three among six randomly chosen model human tumor cell lines are totally deficient in GG-NER exclusively during S implies that many human cancers may be characterized by such a defect. However any potential link between ATR signaling and the striking repair defect in these model tumor strains remains to be determined. Because all three strains express ATR protein and are proficient in H2AX phosphorylation, we offer reasonable speculation that they are nonetheless defective in ATR-mediated phosphorylation of particular downstream effectors which regulate S-phase-specific GG-NER. Thus our data in tumor cell lines may relate to a heretofore unidentified, critical underlying factor in the development of multistage carcinogenesis, where exposure to bulky adduct-inducing environmental genotoxins and subsequent mutation fixation in critical growth control genes plays an important role. Moreover our findings potentially harbor important implications for cancer treatment. Indeed burgeoning evidence supports the notion that NER status of tumors is a major determinant in the clinical response to cisplatin (38), which, like UV, exerts powerful cytotoxic effects via the induction of bulky DNA adducts (39). As such, human cancers that might be identified as totally deficient in S-phase-specific GG-NER would be expected to respond much more effectively, and possibly more selectively, to treatment protocols that include UV-mimetic chemotherapeutic drugs.

## Materials and Methods

**Cell Culture.** Primary lung fibroblasts (HDLFs) were kindly provided by Dr. J. Sedivy (Brown University). The hTERT-immortalized Seckel syndrome skin fibroblast strain F02-98 (carrying a hypomorphic ATR splice-site mutation that profoundly reduces ATR protein expression) (40) and the closely related wild-type hTERT-immortalized control strain 1BR, were a gift of Dr. P. Jeggo (University of Sussex). Normal primary skin fibroblasts (HDSFs; GM01652B), XPA-deficient HDSFs (GM01630), and ATM-deficient HDSFs (AG04405A) were purchased from the Coriell Institute. The above strains were cultured in Eagle's MEM supplemented with 15% fetal bovine serum, L-glutamine, and antibiotics (Wisent, Montreal, Canada). Model tumor strains (U2OS, SAOS-2, 293, DLD-1, A549, and MCF7) were grown in Dulbecco's MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, L-glutamine, and antibiotics.

**Attenuation of p53 and ATR Expression in HDLFs.** For pharmacological inhibition of ATR and ATM, or ATM but not ATR, 10 mmol/l caffeine (Sigma) or 30 μmol/l wortmannin (Calbiochem), respectively, were added to cultures 30 minutes before UV treatment. Knockdown of p53 expression in HDLFs by stable expression of shRNA targeting p53, driven by the pSUPER retroviral vector, was performed as described (14). For siRNA-mediated knockdown of ATR, 2 × 10<sup>5</sup> cells were plated in 35-mm dishes 1 day before siRNA transfection in complete growth media without antibiotics. siRNAs targeting human ATR (sc-29763), or nontargeting siRNAs (sc-37007), were purchased from Santa Cruz. siRNAs were transfected into cells using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's (Invitrogen) directions, and cells were used at 2 days posttransfection.

**Irradiation Conditions.** Cell monolayers growing in 60-mm dishes were washed thoroughly with phosphate-buffered saline (PBS) and covered with 2 ml of PBS, followed by UV irradiation with a Philips G25T8 germicidal lamp at a fluence of 0.2 J/m<sup>2</sup>/s.

**Protein Detection.** Western blotting using antibodies (Santa Cruz) for p53 (DO-1 antibody, 1:5000 dilution), ATR (N-19 antibody, 1:500 dilution), and TFIIFp89 (S-19 antibody, 1:500 dilution) was performed as previously described (15).

For immunofluorescence detection of γ-H2AX or ATR, cells were grown on coverslips in 35-mm dishes, treated with UV, and fixed for 15 minutes in PBS/3% paraformaldehyde. Cells were then washed with PBS and permeabilized for 10 minutes in PBS/0.5% Triton X-100, blocked for 1 h in PBS/10%

FBS/0.1% Triton X-100, and incubated with a primary mouse monoclonal anti-human  $\gamma$ -H2AX antibody (1:500; Upstate) or goat polyclonal anti-human ATR antibody (N-19 antibody, 1:50, Santa Cruz Biotechnology) for 2 hours. Cells were washed with PBS and incubated for 1 h with an Alexa 488 goat anti-mouse IgG secondary antibody or an Alexa 488 donkey anti-goat IgG secondary antibody (Molecular Probes). Cells were washed with PBS and nuclei stained with 0.2  $\mu$ g/ml DAPI (Sigma). Fluorescence was visualized with a Leica DMRE microscope, and data acquired using a RETIGA EX digital camera (QIMAGING) coupled with OpenLab 3.1.1 software (OpenLab).

**Determination of GG-NER Kinetics as a Function of Cell Cycle.** Exponentially growing, asynchronous monolayers were UV-irradiated and immediately refed with normal culture medium. At various times posttreatment, cultures were washed with PBS, trypsinized, resuspended in 1 ml of PBS, and fixed by addition of 3 ml ice-cold 100% ethanol. Next,  $2.5 \times 10^5$  fixed cells were resuspended in either 0.5% Triton-X-100/2 N HCl (for CPD detection) or 0.5%

Triton-X-100/0.2 N HCl (for 6–4PP detection), and incubated for 10 minutes at 22 °C. Cells were washed with 0.1 mol/l  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (pH 9.0) and then with PBS, and resuspended in 300  $\mu$ l of RNase (100  $\mu$ g/ml in PBS) for 1 h at 37 °C. Cells were centrifuged and resuspended in 300  $\mu$ l PBS-TB (1% BSA/0.25% Tween-20/PBS) containing a primary monoclonal antibody (1:1000; Kamiya Biomedical) against either CPDs or 6–4PPs for 1.5 h at 22 °C, followed by washing with PBS-TB and resuspension in 300  $\mu$ l of PBS-TB containing FITC-conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody (1:200) for 1 h at 22 °C. Pellets were then washed twice with PBS-TB and resuspended in 300  $\mu$ l PBS containing 5  $\mu$ g/ml PI (Molecular Probes). Cells were gated in each phase of the cell cycle and repair kinetics monitored using a flow cytometer (fitted with an argon laser and CellQuestPro software; Becton Dickinson) to quantify the change in geometric mean fluorescence over time, with correction for background autofluorescence.

**ACKNOWLEDGMENTS.** This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (to E.A.D.).

- Melnikova VO, Ananthaswamy HN (2005) Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat Res* 571:91–106.
- Kraemer KH, Lee MM, Scotto J (1984) DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: Evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis* 5:511–514.
- Gillet LC, Schärer OD (2006) Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev* 106:253–276.
- Fousteri M, Mullenders LH (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: Molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res* 18:73–84.
- Paulsen RD, Cimprich KA (2007) The ATR pathway: Fine-tuning the fork. *DNA Repair* 6:953–966.
- Tibbetts RS et al. (1999) A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13:152–157.
- Ford JM, Hanawalt PC (1995) Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci* 92:8876–8880.
- Mathonnet G et al. (2003) UV wavelength-dependent regulation of transcription-coupled nucleotide excision repair in p53-deficient human cells. *Proc Natl Acad Sci* 100:7219–7224.
- Tron VA et al. (1998) p53-dependent regulation of nucleotide excision repair in murine epidermis in vivo. *J Cutan Med Surg* 3:16–20.
- Ford JM, Hanawalt PC (1997) Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J Biol Chem* 272:28073–28080.
- Ford JM, Baron EL, Hanawalt PC (1998) Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Res* 58:599–603.
- Adimoolam S, Lin CX, Ford JM (2001) The p53-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 (cip1, waf1, sdi1), is not required for global genomic and transcription-coupled nucleotide excision repair of UV-induced DNA photoproducts. *J Biol Chem* 276:25813–25822.
- Ferguson BE, Oh DH (2005) Proficient global nucleotide excision repair in human keratinocytes but not in fibroblasts deficient in p53. *Cancer Res* 65:8723–8729.
- Rouget R et al. (2007) A sensitive flow cytometry-based nucleotide excision repair assay unexpectedly reveals that mitogen-activated protein kinase signalling does not regulate the removal of UV-induced DNA damage in human cells. *J Biol Chem* 283:5533–5541.
- Loignon M, Drobetsky EA (2002) The initiation of UV-induced G(1) arrest in human cells is independent of the p53/p21/pRb pathway but can be attenuated through expression of the HPV E7 oncoprotein. *Carcinogenesis* 23:35–45.
- Mitchell DL, Haispe CA, Clarkson JM (1985) (6–4) Photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutat Res*, 143:109–112.
- Sarkaria JN et al. (1999) Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res* 59:4375–4382.
- Hanasoge S, Ljungman M (2007) H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis* 28:2298–2304.
- Greiner R, et al. (2000) The dose dependence of cyclobutane dimer induction and repair in UVB-irradiated human keratinocytes. *Photochem Photobiol* 72:701–708.
- Sarkaria JN et al. (1998) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res* 58:4375–4382.
- Burma S et al. (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 276:42462–424567.
- Wang YC, Maher VM, Mitchell DL, McCormick JJ (1993) Evidence from mutation spectra that the UV hypermutability of xeroderma pigmentosum variant cells reflects abnormal, error-prone replication on a template containing photoproducts. *Mol Cell Biol* 13:4276–4283.
- Mitchell DL, Cleaver JE, Lowery MP, Hewitt RR (1995) Induction and repair of (6–4) photoproducts in normal human and xeroderma pigmentosum variant cells during the cell cycle. *Mutat Res* 337:161–167.
- Tommasi S, Oxygloglu AB, Pfeifer GP (2000) Cell cycle-independent removal of UV-induced pyrimidine dimers from the promoter and the transcription initiation domain of the human CDC2 gene. *Nucleic Acids Res* 28:3991–3998.
- Thyagarajan B et al. (2007) Alkaline unwinding flow cytometry assay to measure nucleotide excision repair. *Mutagenesis* 22:147–153.
- Stiff T et al. (2006) ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J* 25:5775–5782.
- Colton SL, Xu XS, Wang YA, Wang G (2006) The involvement of ataxia-telangiectasia mutated protein activation in nucleotide excision repair-facilitated cell survival with cisplatin treatment. *J Biol Chem* 281:27117–27125.
- Oakley GG et al. (2001) UV-induced hyperphosphorylation of replication protein A depends on DNA replication and expression of ATM protein. *Mol Biol Cell* 12:1199–1213.
- Block WD, Yu Y, Lees-Miller SP (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase-like serine/threonine protein kinases (PIKKs) are required for DNA damage-induced phosphorylation of the 32 kDa subunit of replication protein A at threonine 21. *Nucleic Acids Res* 32:997–1005.
- Zou Y, Liu Y, Wu X, Shell SM (2006) Functions of human replication protein A (RPA): From DNA replication to DNA damage and stress responses. *J Cell Physiol* 208:267–273.
- Matsuoka S et al. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316:1160–1166.
- Wu X, Shell SM, Yang Z, Zou Y (2006) Phosphorylation of nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A by ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related-dependent checkpoint pathway promotes cell survival in response to UV irradiation. *Cancer Res* 66:2997–3005.
- Wu X, Shell SM, Liu Y, Zou Y (2007) ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. *Oncogene* 26:757–764.
- Gatei M et al. (2001) Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of BRCA1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *J Biol Chem* 276:17276–17280.
- Hartman AR, Ford JM (2002) BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet* 32:180–184.
- Chini CC, Chen J (2006) Repeated phosphopeptide motifs in human Claspin are phosphorylated by Chk1 and mediate Claspin function. *J Biol Chem* 281:33276–33282.
- Praetorius-Ibba M et al. (2007) Role of Claspin in regulation of nucleotide excision repair factor DDB2. *DNA Repair* 6:578–587.
- Olausson KA et al. (2006) DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 355:983–989.
- Bhana S, Hewer A, Phillips DH, Lloyd DR (2008) p53-dependent global nucleotide excision repair of cisplatin-induced intrastrand crosslinks in human cells. *Mutagenesis* 23:131–136.
- O'Driscoll M et al. (2003) A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* 33:497–501.