



HAL
open science

LES PROTEINES KIN17, XPC, DNA-PKCS ET XRCC4 DANS LA REPONSE CELLULAIRE AUX DOMMAGES DE L'ADN. ETUDE DES RELATIONS ENTRE LA REPARATION PAR EXCISION DE NUCLEOTIDES ET LA RECOMBINAISON NON HOMOLOGUE DANS UN MODELE SYNGENIQUE HUMAIN

Emmanuelle Despras

► **To cite this version:**

Emmanuelle Despras. LES PROTEINES KIN17, XPC, DNA-PKCS ET XRCC4 DANS LA REPONSE CELLULAIRE AUX DOMMAGES DE L'ADN. ETUDE DES RELATIONS ENTRE LA REPARATION PAR EXCISION DE NUCLEOTIDES ET LA RECOMBINAISON NON HOMOLOGUE DANS UN MODELE SYNGENIQUE HUMAIN. Biologie cellulaire. Université René Descartes - Paris V, 2006. Français. NNT : . tel-00432998

HAL Id: tel-00432998

<https://theses.hal.science/tel-00432998>

Submitted on 17 Nov 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS V – RENE DESCARTES

U.F.R BIOMEDICALE DES SAINTS-PERES
ECOLE DOCTORALE GENETIQUE, CELLULE, IMMUNOLOGIE, INFECTIOLOGIE,
DEVELOPPEMENT

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

présentée et soutenue publiquement par

M^{elle} Emmanuelle DESPRAS

le 26/10/2006

*LES PROTEINES KIN17, XPC, DNA-PKCS ET XRCC4 DANS LA REPONSE
CELLULAIRE AUX DOMMAGES DE L'ADN. ETUDE DES RELATIONS ENTRE LA
REPARATION PAR EXCISION DE NUCLEOTIDES ET LA RECOMBINAISON NON
HOMOLOGUE DANS UN MODELE SYNGENIQUE HUMAIN.*

Directeur de thèse : Dr Jaime F. ANGULO-MORA

JURY : Pr. Michel VIDAUD (Président)
Dr. Dietrich AVERBECK (Rapporteur)
Dr. Yvan CANITROT (Rapporteur)
Dr. Alain SARASIN (Examineur)
Dr. Jean-Pierre DE VILLARTAY (Examineur)
Dr. Denis BIARD (Examineur)

Remerciements

Au Professeur Michel Vidaud qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Aux Docteurs Dietrich Averbeck et Yvan Canitrot qui ont endossé le lourd rôle de rapporteur au sein de ce jury. Je les remercie de l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et du temps qu'ils ont consacré à lire et à commenter ce manuscrit.

Aux Docteurs Jean-Pierre De Villartay et Alain Sarasin pour avoir accepté de juger ce travail.

Cette thèse a été effectuée au sein du Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité (CEA) sous la direction du Docteur Jaime Angulo-Mora et en étroite collaboration avec le Docteur Denis Biard. En premier lieu, je tiens à les remercier de la confiance qu'ils m'ont accordée malgré mon cursus peu conventionnel. Leur rigueur et leur enthousiasme ont constitué une excellente école. Leurs commentaires m'ont été d'une aide précieuse pour la rédaction de ce manuscrit. Je remercie particulièrement Denis du temps qu'il a passé à m'initier à de nombreuses techniques expérimentales.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de pouvoir voyager pour acquérir de nouvelles techniques. Je suis particulièrement redevable au Docteur Petra Pfeiffer et à tous ses collaborateurs (Emil, Andrea, Elke, Steffi) pour mon séjour agréable à l'Institut de Génétique de l'Université d'Essen (Allemagne). Grâce à leurs conseils et à leur grande disponibilité, j'ai pu mettre en place sans trop de heurts la technique du NHEJ in vitro dans mon

laboratoire. Je remercie le Professeur Bernard Salles de m'avoir accueillie à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (CNRS, Toulouse) où j'ai pu effectuer les expériences de recrutement de facteurs du NHEJ sous les conseils avisés du Docteur Patrick Calsou. Ces deux collaborations ont été des opportunités formidables et particulièrement enrichissantes.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mes collègues du LGR pour leur accueil et leur soutien. Une mention spéciale à Laurent, Karène et Emilie avec lesquels j'ai eu la chance de partager un bureau, des conversations scientifiques passionnantes et des moments de détente salutaires. Je ne suis pas près d'oublier la bonne ambiance régnant dans ce bureau.

Je remercie chaleureusement ma famille et mes amis.

Je remercie enfin le Commissariat à l'Energie Atomique et la Ligue Nationale contre le Cancer pour avoir contribué au financement de ce travail.

Sommaire

ABREVIATIONS	7
--------------	---

INTRODUCTION

STRESS GENOTOXIQUE ET REPARATION DE L'ADN	9
---	---

I. LA REPARATION PAR EXCISION DE NUCLEOTIDES	14
---	-----------

I.1. Les dommages de l'ADN pris en charge par le NER	14
---	-----------

A) Dommages causés par les UV	14
-------------------------------	----

B) Adduits formés par des molécules électrophiles	14
---	----

C) Diversité des lésions prises en charge par le NER	15
--	----

I.2. Facteurs et étapes du NER	17
---------------------------------------	-----------

A) Reconnaissance des dommages et initiation du NER	18
---	----

B) Formation du complexe de pré-incision	21
--	----

C) Incision du fragment endommagé	23
-----------------------------------	----

D) Etape de re-synthèse et ligation	23
-------------------------------------	----

I.3. Cinétique de réparation des dommages pris en charge par le NER	26
--	-----------

A) Réponse bi-phasique	26
------------------------	----

B) Type de dommage	26
--------------------	----

C) Localisation dans le génome	26
--------------------------------	----

I.4. Réplication trans-lésionnelle	27
---	-----------

I.5. Pathologies associées à un défaut du NER	27
--	-----------

A) La trichothiodystrophie	28
----------------------------	----

B) Le syndrome de Cockayne	28
----------------------------	----

C) Xeroderma pigmentosum	29
--------------------------	----

II. LA REPARATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN DE L'ADN PAR LE NHEJ	32
--	-----------

II.1. Les cassures double-brin de l'ADN : production, signalisation et réparation	33
--	-----------

A) Origine des DSB	33
--------------------	----

B) Voies activées par les DSB	34
-------------------------------	----

C) Contribution du NHEJ et de la RH au maintien de l'intégrité génétique	37
--	----

II.2. Les protéines impliquées dans le NHEJ	38
--	-----------

A) La protéine kinase dépendant de l'ADN	38
--	----

B) Artemis	40
------------	----

C) Le complexe XRCC4/Ligase IV	41
--------------------------------	----

D) XLF-Cernunnos	42
------------------	----

E) Autres activités impliquées dans le NHEJ	42
---	----

II.3. Modèle(s) du NHEJ	45
--------------------------------	-----------

A) NHEJ dépendant de DNA-PK	45
-----------------------------	----

B) Voies alternatives du NHEJ	53
-------------------------------	----

II.4. Pathologies humaines associées à un défaut du NHEJ	59
A) SCID et RS-SCID	59
B) Mutations hypomorphiques de LigIV	60
C) Mutations de XLF-CERNUNNOS	60
III. LA PROTEINE KIN17	62
III.1. Conservation des protéines kin17 au cours de l'évolution	62
III.2. Régulation de l'expression de la protéine kin17	66
III.3. Domaines fonctionnels de la protéine kin17	67
III.4. Interaction de la protéine kin17 avec les acides nucléiques	68
A) Interaction de la protéine kin17 avec l'ADN, implication dans le métabolisme de l'ADN	68
B) Interaction de la protéine kin17 avec l'ARN, implication éventuelle dans la transcription	69
III.5. Implication de la protéine kin17 dans la réponse au stress génotoxique	70
A) La protéine kin17 dans la réponse cellulaire aux UVC	70
B) La protéine kin17 et la réponse cellulaire aux radiations ionisantes	71

RESULTATS

ARTICLE I	73
ARTICLE II	87
ARTICLE III	102
ARTICLE IV	120
L'interférence ARN à long terme	121
1. L'interférence ARN comme outil biologique	121
2. Mécanismes moléculaires de l'interférence ARN	122
A) Le complexe RISC	122
B) miRNA et siRNA	122
C) Mode d'action des siRNA et des miRNA	123
3. Introduction d'ARN double-brin dans des cellules de mammifères à des fins expérimentales	125
4. Structures shRNA et vecteurs d'expression	126
5. Design des séquences shRNA	127
Article IV	128
ARTICLE V	143
Principes de l'analyse du NHEJ <i>in vitro</i>	144
1. Caractéristiques des tests de NHEJ <i>in vitro</i>	144
A) Intérêts des tests <i>in vitro</i> par rapport aux tests <i>in vivo</i>	144
B) Difficultés inhérentes aux méthodes <i>in vitro</i>	146
2. Mécanismes du NHEJ <i>in vitro</i>	147
A) Produits obtenus après la réparation de coupures enzymatiques	147
B) Une définition de la fidélité du NHEJ <i>in vitro</i>	148
3. Protocole utilisé dans le cadre de cette thèse	150
A) Obtention d'extraits totaux actifs pour le NHEJ	150

B) Substrats	150
C) Réaction de réparation et analyse des produits	152
Résultats préliminaires	153
Article V	164
Résultats additionnels	190

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

LA PROTEINE KIN17, LA REPLICATION ET LA REPOSE AUX DOMMAGES DE L'ADN	201
1. La protéine kin17 et la réplication de l'ADN	201
A) Niveau d'expression de la protéine kin17 et prolifération	201
B) Rôle(s) de la protéine kin17 dans la réplication de l'ADN ?	202
2. La protéine kin17 dans la réponse aux atteintes génotoxiques	204
A) Association de la protéine kin17 avec la chromatine et dommages de l'ADN	204
B) Réponse de la protéine ^{HSA} kin17 à différents agents génotoxiques	205
C) Implication de la protéine ^{HSA} kin17 dans la radiosensibilité	206
D) Un rôle de la protéine ^{HSA} kin17 dans la réponse aux DSB ?	207

UN MODELE SYNGENIQUE DE CELLULES HUMAINES POUR L'ETUDE DES MECANISMES DE REPARATION DE L'ADN : LES EXEMPLES DU NER ET DU NHEJ	210
1. Validation du système de vecteurs pEBV-siRNA	211
2. Qu'apprend-on des cellules HeLa déficientes en NHEJ ?	212
A) Phosphorylation de la protéine XRCC4 après induction de DSB	212
B) Les protéines DNA-PKcs et XRCC4 sont impliquées dans la réparation des DSB induites par l'étoposide	214
C) Radiosensibilité des cellules DNA-PKcs ^{KD} et XRCC4 ^{KD} et NHEJ in vitro	215
3. Un modèle pour l'étude des relations entre mécanismes de réparation : l'exemple de la protéine XPC	217

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES	222
1. Test de NHEJ <i>in vitro</i>	222
2. EMSA	225
3. Mesure de l'activité kinase de DNA-PKcs	226

REFERENCES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	227
------------------------------------	------------

Abréviations

AgT	antigène T
APH	aphidicoline
APE1	<i>apurinic/aprimidic endonuclease 1</i>
ARNi	interférence ARN
ARN pol II	polymérase à ARN de type II
AT	syndrome d' <i>ataxia telangiectasia</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM Rad3-related protein</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
BET	bromure d'éthidium
BER	réparation par excision de bases
B-NHEJ	<i>backup NHEJ</i>
BRCA1/2	<i>breast cancer associated protein 1/2</i>
CAL	calicheamicine
Chk	<i>checkpoint kinase</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CDK	cycline dépendant des kinases
CMV	cytomégalovirus
CPD	dimère de pyrimidine cyclobutane
CPT	camptothécine
CS	syndrome de Cockayne
CS-A et B	groupes de complémentation de CS
CSR	<i>class-switch recombination</i>
DDB1/2	<i>DNA damage binding protein 1/2</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PKcs	sous-unité catalytique de la DNA-PK
D-NHEJ	<i>DNA-PK-dependent NHEJ</i>
DSB	cassure double-brin de l'ADN
EBV	virus d'Epstein-Barr
ERCC	<i>excision repair cross-complementing</i>
FEN-1	<i>flap endonuclease 1</i>
GGR	réparation globale du génome
HE	hydrolyse enzymatique
HR23	homologue de Rad23
HU	hydroxyurée
<i>HSA</i> kin17	protéine kin17 humaine
<i>HSA</i> KIN17	gène kin17 humain
<i>MMU</i> kin17	protéine kin17 de souris
<i>MMU</i> KIN17	gène kin17 de souris
KD	<i>knock-down</i>
KO	<i>knock-out</i>
KOW	motif Kyprides, Ouzonis, Woese
LigIII	Ligase III

LigIV	Ligase IV
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint 1</i>
MEF	fibroblastes embryonnaires de souris
MHEJ ou MMEJ	<i>microhomology-mediated end joining</i>
MIMO	L-mimosine
miRNA	<i>micro RNA</i>
MMR	réparation des mésappariements
MRN	complexe Mre11/Rad50/Nbs1
NCS	néocarzinostatine
NER	réparation par excision de nucléotides
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> (recombinaison non homologue)
NLS	signal de localisation nucléaire
PARP	poly(ADP-ribose) polymérase
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
pEBV	vecteurs dérivés du virus d'Epstein-Barr
PNK	<i>polynucleotide kinase</i>
Pol	polymérase à ADN
6-4 PP	photoproduit pyrimidine (6-4) pyrimidone
RASK	<i>RKO antisens kin17</i>
RH	recombinaison homologue
RI	radiations ionisantes
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RFC	<i>replication factor C</i>
ROS	espèces actives de l'oxygène
RPA	<i>replication protein A</i>
RS-SCID	<i>radiosensitive SCID</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SSA	<i>single-strand annealing</i>
SSB	cassure simple-brin de l'ADN
SV-40	virus de singe 40
TCR	réparation couplée à la transcription
TDP1	<i>tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1</i>
TdT	déoxynucléotidyltransférase terminale
TFIIH	facteur de transcription IIH
TLS	synthèse trans-lésionnelle
Topo II	topoisomérase de type II
TP53BP1	<i>tumor protein 53 binding protein 1</i>
TTD	trichothiodystrophie
UDS	<i>unscheduled DNA synthesis</i>
UV	ultraviolet
XP	<i>xeroderma pigmentosum</i>
XP-A à G	groupes de complémentation de XP
XP-V	variant de XP
XRCC	<i>X-ray cross complementing</i>
WRN	hélicase Werner
WS	syndrome de Werner
ZF	doigt de zinc
γ -H2AX	forme phosphorylée de l'histone H2AX

Introduction

Stress génotoxique et réparation de l'ADN

Au cours de la vie cellulaire, l'ADN, support de l'information génétique, est soumis à des atteintes d'origine endogène ou exogène qui entraînent une grande variété de modifications. Si elles ne sont pas réparées correctement, les lésions de l'ADN peuvent causer l'apparition de mutations et entraîner instabilité génétique et cancer (pour revue voir Hoeijmakers, 2001).

Les liaisons chimiques au sein de la double hélice d'ADN peuvent s'altérer spontanément : perte du groupement amino-exocyclique (déamination) ou hydrolyse de la liaison des bases au désoxyribose (dépuration ou dépyrimidination). Malgré une fidélité importante, il arrive également que la machinerie de réplication de l'ADN commette des erreurs conduisant à des mésappariements. Enfin, l'action de sous-produits du métabolisme cellulaire normal est une source importante de dommages de l'ADN. Ainsi, il existe plus de cent modifications de l'ADN causées par les espèces actives de l'oxygène (ROS de l'anglais *reactive oxygen species*) qui sont indissociables de processus cellulaires normaux telle la respiration oxydative.

L'ADN est également exposé à des agents génotoxiques environnementaux tels les ultraviolets (UV), les radiations ionisantes (RI) et de nombreux agents chimiques comme les hydrocarbures polycycliques présents dans la fumée de cigarette. Ces sources exogènes induisent une grande variété de lésions allant de l'oxydation de bases aux cassures double-brin de l'ADN (DSB de l'anglais *double-strand break*) en passant par les cassures simple-brin (SSB de l'anglais *single-strand break*), les pontages intra- et inter-brin et la formation d'adduits volumineux qui gênent le déroulement de processus cellulaires majeurs comme la réplication et la transcription.

Introduction

A court terme, la présence de lésions de l'ADN peut entraîner le blocage de la transcription, le blocage de la réplication, l'arrêt du cycle cellulaire, la mise en œuvre de mécanismes de réparation et/ou la mort cellulaire. L'accumulation de dommages de l'ADN peut entraîner l'apparition de mutations et, à plus long terme, la cancérogénèse. Ceci est accentué dans le cadre d'un défaut hérité ou acquis de protéines impliquées dans la surveillance et la réparation du génome.

La cellule dispose de différents mécanismes de réparation de l'ADN permettant de prendre en compte la variété des dommages rencontrés (Figure 1). Ces voies sont largement conservées au cours de l'évolution.

- La réparation des mésappariements (MMR de l'anglais *mismatch repair*) assure la correction des erreurs d'appariements faites par les polymérases et prend en charge les boucles d'insertion/délétion résultant d'un saut durant la réplication de séquences répétées ou durant la recombinaison. Des mutations des protéines du MMR sont fréquemment retrouvées dans certains cancers du colon.
- La réparation par excision de base (BER de l'anglais *base excision repair*) répare les dommages des bases issus du métabolisme cellulaire comme les oxydations, les méthylations, les déaminations et les hydroxylations mais également les SSB créées par une irradiation.
- La réparation par excision de nucléotide (NER de l'anglais *nucleotide excision repair*) prend en charge une grande variété de lésions dont la caractéristique est d'induire une déformation de la double hélice d'ADN. Parmi ces lésions, on trouve les dimères de pyrimidines induits par les UV. Les mutations des gènes du NER sont impliquées dans trois syndromes humains : le *xeroderma pigmentosum* (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la trichothiodystrophie (TTD). En particulier, XP se caractérise par une augmentation très importante du risque de cancer de la peau.

Introduction

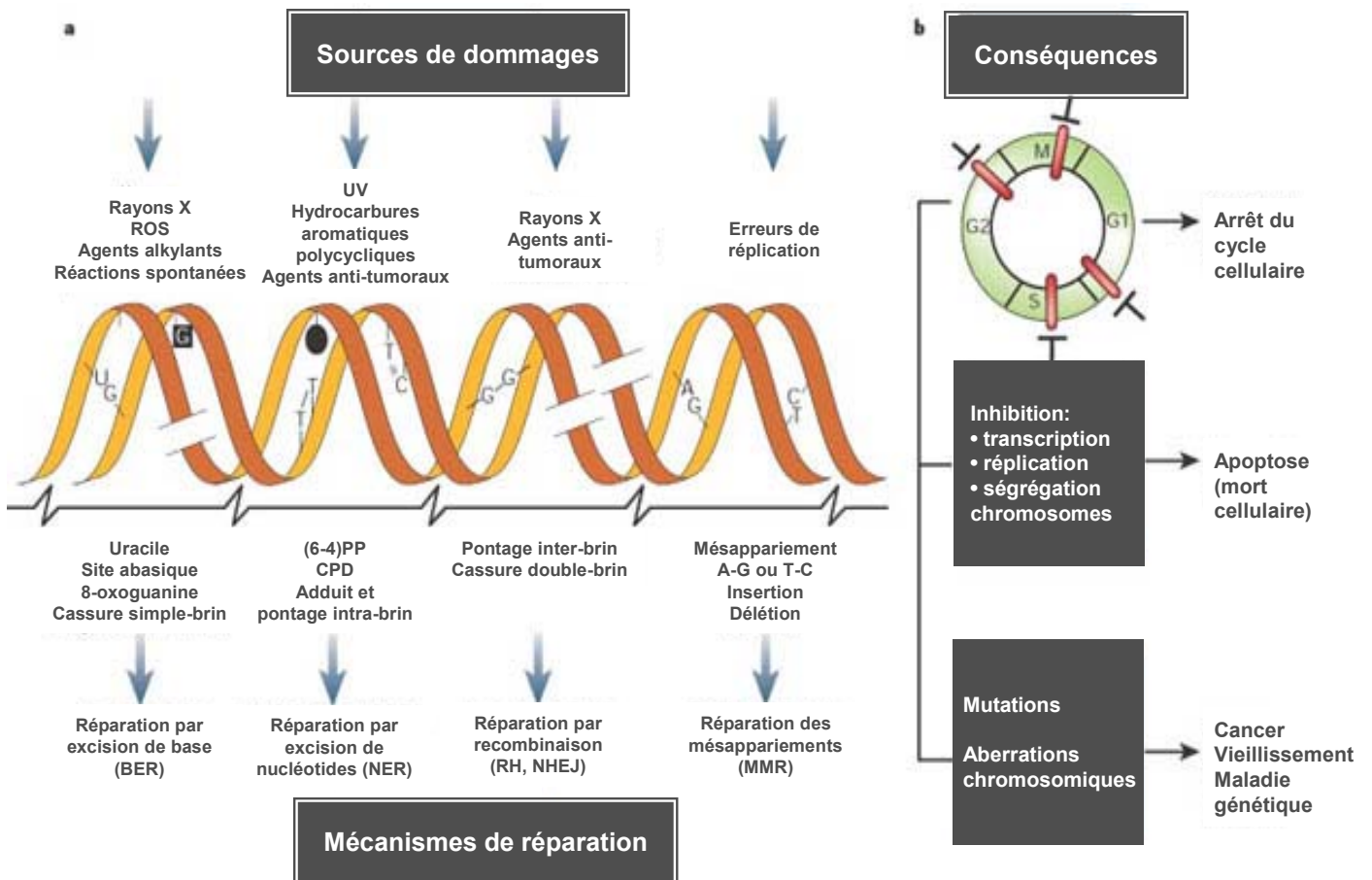


Figure 1: Différentes voies de réparation pour prendre en charge une grande variété de lésions de l'ADN. (a) Principales lésions de l'ADN (milieu) induites par différents agents génotoxiques (haut) et mécanismes de réparation les prenant en charge (bas). (b) Conséquences des lésions de l'ADN sur les processus cellulaires et l'intégrité du génome (d'après Hoeijmakers, 2001).

Introduction

- La recombinaison homologue (RH) et la réparation par jonction directe des extrémités ou recombinaison non homologue (NHEJ de l'anglais *non-homologous end joining*) sont les deux principaux mécanismes de réparation des DSB. La RH est un mécanisme de réparation conservatif qui nécessite la présence d'une séquence homologue à la séquence endommagée, chromatide sœur, chromosome homologue ou séquences répétées. Contrairement à la RH, le NHEJ ne nécessite pas d'homologie et joint directement deux extrémités d'ADN. Il présente donc un risque de réparation imprécise. La RH intervient essentiellement dans les phases S et G2 du cycle cellulaire alors que le NHEJ est opérationnel dans toutes les phases (Rothkamm et al., 2003). Un troisième mécanisme, le SSA (de l'anglais *single-strand annealing*), permet la réparation de DSB situées au sein de séquences répétées. Il entraîne une délétion et ne constitue donc pas un processus conservatif.
- Enfin, certaines lésions peuvent être directement prises en charge par une seule enzyme. Ainsi, les ligases peuvent suturer une cassure de l'ADN présentant des extrémités cohésives. La O⁶-méthylguanine méthyltransférase (MGMT) est une enzyme spécialisée dans la réversion des adduits de la O⁶-guanine. De nombreuses tumeurs humaines présentent une perte de la fonction de la MGMT (Esteller and Herman, 2004). Les photolyases, quant à elles, sont capables de réverser les dimères de pyrimidine en présence de lumière. On parle de photoréactivation. Elles sont trouvées dans de nombreux organismes, de la bactérie aux vertébrés, mais semblent absentes chez les mammifères placentaires (Sancar, 2003).

Introduction

Objectifs de la thèse :

L'objectif principal de mon travail de thèse était d'étudier l'implication de certaines protéines nucléaires dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. La protéine kin17 est une protéine nucléaire très conservée au cours de l'évolution et activée par de nombreux agents génotoxiques tels les UV et les RI. Elle pourrait en outre participer à la réplication de l'ADN. Je me suis particulièrement intéressée à la réponse de la protéine kin17 humaine (*HSAkin17*) aux traitements induisant des DSB et/ou un blocage des fourches de réplication. Ce travail m'a conduit à aborder deux des mécanismes de réparation évoqués ci-dessus, le NER et le NHEJ, et d'analyser leurs interactions potentielles et leurs contributions respectives à la survie cellulaire dans un modèle syngénique humain développé au laboratoire. Ces deux voies de réparation seront donc décrites chez les eucaryotes supérieurs de façon plus exhaustive dans la suite de cette introduction qui s'achèvera sur une présentation de la protéine kin17.

I. La réparation par excision de nucléotides

I.1. Les dommages de l'ADN pris en charge par le NER

Le NER est considéré comme la voie de réparation la plus flexible, puisqu'il prend en charge une grande variété de lésions (Tableau 1) dont la caractéristique commune est d'induire une distorsion de la double hélice d'ADN (pour revue voir Gillet and Scharer, 2006).

A) Dommages causés par les UV

Le spectre UV se décompose en UVA (320 à 400 nm), UVB (290 à 320 nm) et UVC (200 à 290 nm). Les lésions de l'ADN causés par les UV sont essentiellement des dimères de pyrimidine cyclobutane (CPD) et des photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4 PP). Cependant, les UVA peuvent également induire un stress oxydatif et l'oxydation des bases de l'ADN (Pfeifer et al., 2005). La majorité des CPD implique des thymines adjacentes (TT) mais, selon la longueur d'onde, la dose et les séquences adjacentes, des dimères TC, CT ou CC peuvent également se former. Les CPD induisent une distorsion limitée de la double hélice d'ADN et conservent l'appariement des bases. Les 6-4 PP impliquent préférentiellement des TC, CC et TT et sont formés avec un taux correspondant à 25 à 30% de celui des CDP. Les 6-4 PP induisent une distorsion plus prononcée de l'ADN avec une perte de l'appariement des bases au site de lésion.

B) Adduits formés par des molécules électrophiles

Le NER est également impliqué dans la réparation d'adduits d'origine chimique tels les hydrocarbures aromatiques polycycliques (induits par la fumée de cigarette) et des pontages

Introduction

intra-brins (induits par des agents chimiothérapeutiques comme la mitomycine C et le cisplatine et par certains métabolites cellulaires). En association avec d'autres voies de réparation telle la RH, certaines protéines du NER sont également impliquées dans la prise en charge des pontages inter-brins (pour revue voir McHugh et al., 2001).

C) Diversité des lésions prises en charge par le NER

L'efficacité de réparation du NER est corrélée avec l'importance de la distorsion de la double hélice d'ADN entraînée par la lésion (Tableau 1). Les protéines du NER seraient donc sensibles à une modification de la conformation de la double hélice plutôt qu'à une modification particulière des bases de l'ADN. En particulier, l'interaction du senseur de dommages du NER qu'est le complexe XPC/HR23B avec l'ADN nécessiterait la présence de bases désappariées au site de lésion (Sugasawa et al., 2002). L'analyse de l'excision de sondes d'ADN synthétiques par des extraits de cellules humaines montre que le recrutement des protéines du NER aux sites de lésions nécessite la présence d'une déformation du brin intact du substrat (Buterin et al., 2005).

Tableau 1 : Diversité des lésions prises en charge par le NER. Ce tableau présente les différents types de modifications de l'ADN prises en charge par le NER, les déformations de la double hélice qu'elles entraînent ainsi que l'efficacité de réparation quand elle est connue. Abréviations : Mg, sillon majeur ; mg, sillon mineur ; del., délétion ; nd, non déterminé, B[a]P, benzo[a]pyrène ; B[c]Ph, benzo[c]phénanthrène ; AAF, acétylamino-fluorène ; AF, amino-fluorène ; PhIP, 2-amino-1-méthyl-6-phényl-imidazole[4,5-b]pyridine ; IQ, 2-amino-3-méthylimidazo-[4,5-f]quinoline ; APy, aminopyrène ; AB, aminobiphényle. Conformation **A** : l'adduit reste externe à la double hélice et l'appariement des bases est conservé. Conformation **B** : l'adduit s'intercale dans la double hélice d'ADN et déplace la base modifiée de sa position canonique avec perte de l'appariement. Conformation **B'** : l'adduit s'intercale dans la double hélice mais l'appariement est conservé (d'après Gillet and Schärer, 2006).

Introduction

Lésions / Adduits	Structure de l'ADN	Taux de réparation
Lésions UV		
CPD	courbure : 7°-30° courbure du Mg relaxation : 9°	+/-
CPD : mésappariement GG	courbure >30°, flexibilité Mg augmenté, mg rétréci	+++
6-4 PP	courbure : 44°	+++
Adduits de platine		
cisplatine 1,2d(GpG) intra-brin	courbure : 30°-55° courbure du Mg, mg augmenté relaxation : 13°-25° courbure : 20°-35°	+/-
cisplatine 1,3-d(GpNpG) intra-brin	courbure Mg, mg augmenté relaxation : 19°-23° dénaturation locale sur 2 bp	+++
transplatine 1,3-intra-brin	courbure 60°, flexibilité dénaturation locale sur 4 bp	+++
bis-platine (PtPt) 1,3-intra-brin	courbure flexible non directionnelle petite distorsion locale pas de région simple brin	+/-
Hydrocarbures aromatiques polycycliques		
(+)- <i>trans</i> -B[a]P-dG : dC	A	+/-
(-)- <i>trans</i> -B[a]P-dG : dC	A	+/-
(+)- <i>trans</i> -B[a]P-dG : del.	B	-
(-)- <i>trans</i> -B[a]P-dG : del.	pas de disruption des bases adjacentes	nd
(+)- <i>cis</i> -B[a]P-dG : dC	B	++
(-)- <i>cis</i> -B[a]P-dG : dC	B	+++
(+)- <i>cis</i> -B[a]P-dG : del.	B	+/-
(-)- <i>cis</i> -B[a]P-dG : del.	nd	+/-
(+)- <i>cis</i> -B[a]P-dA : dT	B	nd
(+)- <i>trans</i> -B[a]P-dA : dT	B distorsion	+
(-)- <i>trans</i> -B[a]P-dA : dT	B'	+/-
(+)- <i>trans</i> -B[c]Ph-dG : dC	B'	nd
(-)- <i>trans</i> -B[c]Ph-dG : dC	B'	nd
(+)- <i>trans</i> -B[c]Ph-dA : dT	B	-
(-)- <i>trans</i> -B[c]Ph-dA : dT	B	-
Amines aromatiques		
dG-AAF : dC	B	+++
dGAF : dC	A:B (90:10 à 50:50)	+/-
dG-AF : del.	B	nd
dG-AF : double del.	B	nd
dG-PhIP : dC	A:B	nd
dG-IQ : dC	A:B	nd
dG-Apy : dC	B	+++
dG-AB	A	nd
Autres		
Adduit de cholestérol	B	+++
Mono-adduit de psoralène	courbure: 8° relaxation: 34°	+

I.2. Facteurs et étapes du NER

Les protéines majeures du NER sont relativement bien connues et il est possible de reconstituer la réaction de réparation *in vitro* en utilisant des protéines purifiées. Les facteurs protéiques impliqués dans le NER (Tableau 2) ne constituent pas un complexe de réparation pré-établi mais sont recrutés de façon séquentielle aux sites de dommages de l'ADN. Schématiquement, le NER peut se décomposer en quatre étapes : (i) reconnaissance de la lésion, (ii) ouverture de la double hélice d'ADN, (iii) excision du brin endommagé, (iv) re-synthèse et ligature (pour revue voir Cleaver, 2005 ; Costa et al., 2003; de Boer and Hoeijmakers, 2000; Friedberg, 2001; Park and Choi, 2006).

Le NER se divise en deux voies :

- La réparation couplée à la transcription (TCR de l'anglais *transcription coupled repair*) prend en charge les lésions situées sur le brin transcrit des gènes exprimés. Elle est initiée par le blocage de l'ARN polymérase II (ARN pol II) au site de lésion.
- La réparation globale du génome (GGR de l'anglais *global genome repair*) œuvre dans le reste du génome et est initiée par les complexes XPC/HR23B et UV-DDB.

La suite du processus de réparation est la même pour les deux voies. Des études biochimiques utilisant des extraits protéiques ou des protéines purifiées et le développement de l'irradiation UV localisée *in vivo* ont permis de préciser la séquence d'assemblage des facteurs impliqués dans le NER (Riedl et al., 2003; Tapias et al., 2004; Volker et al., 2001). Un résumé du mécanisme du GGR est présenté Figure 2 à la fin de la section I.2.

Introduction

Facteurs	Gènes	Protéines	Taille (kDa)	Fonction	Partenaires
XPC/HR23B	<i>HR23B</i>	HR23B	43	Reconnaissance des lésions	TFIIH
	<i>XPC</i>	XPC	106		XPA
	<i>CEN2</i>	CEN2	20		UV-DDB
UV-DDB	<i>DDB1 (p127)</i>	DDB1	127	Reconnaissance des CPD ? Remodelage de la chromatine ?	XPC
	<i>DDB2 (p48)</i>	DDB2	48		RPA
XPA/RPA	<i>XPA</i>	XPA	31	Rôle architectural ? Vérification de la présence d'une lésion ?	XPC RPA TFIIH ERCC1
	<i>RPA1</i>	RPA70	68	Protection de l'ADN simple brin	XPA
	<i>RPA2</i>	RPA32	30		XPG
	<i>RPA3</i>	RPA14	14		PCNA/RCF
TFIIH	<i>XPB (ERCC3)</i>	XPB	89	hélicase 3'→5'	XPC XPA XPG XPF
	<i>XPB (ERCC2)</i>	XPB	87	hélicase 5'→3'	
	<i>GTF2H1 (TFB1)</i>	p62	62	Liaison à l'ADN ?	
	<i>GTF2H2</i>	p44	44		
	<i>GTF2H3 (TFB4)</i>	p34	34	Liaison à l'ADN ?	
	<i>GTF2H4 (TFB2)</i>	p52	52	Stabilisation TFIIH CAK : phosphoryle l'ARN pol II et d'autres substrats	
	<i>GTF2H5 (TTDA)</i>	p8	9		
	<i>MNAT1 (TFB3)</i>	Mat1	36		
	<i>CDK7</i>	Cdk7	39		
	XPF/ERCC1	<i>CCNH</i>	Cycline H	38	
<i>XPF (ERCC4)</i>		XPF	103	endonucléase 5'	XPA TFIIH
	<i>ERCC1</i>	ERCC1	33		
XPG	<i>XPG</i>	XPG	133	endonucléase 3'	RPA TFIIH PCNA ?
PCNA/RFC	<i>RFC1</i>	RFC1	128	facteur de processivité de PCNA	RPA
	<i>RFC2</i>	RFC2	39		
	<i>RFC3</i>	RFC3	41		
	<i>RFC4</i>	RFC4	40		
	<i>RFC5</i>	RFC5	38		
	<i>PCNA</i>	PCNA (trimère)	3x29	anneau de processivité	pol δ XPG ?
pol δ	<i>p125</i>	p125	124	ADN polymérase	PCNA
	<i>p66</i>	p66	51		
	<i>p50</i>	p50	51		
	<i>p12</i>	p12	12		
pol ε	<i>p261</i>	p261	261	ADN polymérase	PCNA
	<i>p59</i>	p59	59		
	<i>p17</i>	p17	17		
	<i>p12</i>	p12	12		
ligase I	<i>LIG1</i>	ligase I	102	ligature des discontinuités	PCNA

Tableau 2 : Principales protéines impliquées dans le NER. Dans ce tableau sont regroupées les protéines intervenant dans le NER avec mention de leur taille (en kDa) et de leur fonction connue ou supposée. Les partenaires connus sont indiqués dans la dernière colonne (d'après Gillet and Schärer, 2006).

A) Reconnaissance des dommages et initiation du NER

Initiation du TCR

Quand la lésion est présente sur le brin transcrit d'un gène exprimé, c'est le blocage de l'ARN pol II au site de lésion qui déclencherait le TCR (Laine and Egly, 2006). L'ARN pol II arrêtée

Introduction

est phosphorylée et poly-ubiquitinilée par un mécanisme impliquant les protéines CSA et CSB, protéines mutées dans le syndrome humain de Cockayne (CS) (Henning et al., 1995; Troelstra et al., 1992).

La protéine CSA est une protéine de 44 kDa qui co-localise avec la forme hyperphosphorylée de l'ARN pol II dans la matrice nucléaire pendant le déroulement du TCR. Elle est intégrée à un complexe contenant une ligase d'ubiquitine (la protéine Cullin 4A ou Cul4A) et un facteur de régulation du système ubiquitine/protéasome 26S (le signalosome COP9 ou CSN) (Groisman et al., 2003). La protéine CSB est une protéine de 168 kDa et, contrairement à la protéine CSA, elle appartient au complexe d'élongation de l'ARN contenant l'ARN pol II. La protéine CSB fait partie de la famille SWI2/SNF2 d'ATPases dépendant de l'ADN et est capable de remodeler la chromatine *in vitro*. Elle pourrait donc assurer un lien entre réparation, transcription et structure de la chromatine (Citterio et al., 2000). Les protéines CSA et CSB ne sont pas requises pour le GGR.

Initiation du GGR

L'initiation du GGR met en jeu les complexes protéiques XPC/HR23B et UV-DDB ainsi que l'intervention finement régulée du système ubiquitine/protéasome. Le complexe XPC/HR23B est considéré comme le principal détecteur des lésions prises en charges par le GGR (Sugasawa et al., 1998). Son interaction avec l'ADN endommagé provoque une ouverture de la double hélice d'ADN et permet le recrutement des protéines impliquées dans l'étape d'incision du NER (Tapias et al., 2004). Il est secondé par le facteur UV-DDB qui participe à la détection des lésions et aux régulations post-traductionnelles de la protéine XPC (Kulaksiz et al., 2005; Sugasawa et al., 2005; Wang et al., 2005b).

La protéine XPC humaine est une protéine de 125 kDa dont le niveau endogène est contrôlé par la protéine p53 et peut être induit après une exposition aux UV (Adimoolam and Ford, 2002). Les UV entraînent également l'ubiquitination et la sumoylation de la protéine XPC

Introduction

(Wang et al., 2005b). Elle forme un complexe avec la protéine HR23B (de l'anglais *homologue of RAD23*, 58 kDa) de façon constitutive. La protéine HR23B elle-même n'a pas d'affinité pour l'ADN. Cependant, elle stimule l'activité de la protéine XPC *in vitro* et le complexe XPC/HR23B purifié présente une affinité nette pour l'ADN endommagé par les UV (400 fois plus importante que pour de l'ADN intact) (Batty et al., 2000). Une faible fraction de la protéine XPC est associée avec la protéine HR23A, un autre homologue de la protéine de levure RAD23. Le KO murin de HR23B présente un NER normal, ce qui suggère une redondance fonctionnelle entre les protéines HR23B et HR23A dans le NER. L'inactivation des deux gènes est létale chez la souris et a montré que les protéines HR23A et HR23B stabilisent la protéine XPC en la protégeant de la dégradation par le protéasome (Ng et al., 2003). La protéine XPC interagit également avec la centrine 2 (CEN2) entre les résidus 847 et 866 (Nishi et al., 2005; Yang et al., 2006). CEN2 est une protéine partiellement associée aux centrosomes et impliquée dans la duplication des centrioles. L'interaction des protéines XPC et CEN2 stimule le NER *in vitro* et *in vivo* et augmente l'affinité de la protéine XPC pour les 6-4 PP (Nishi et al., 2005). Cette interaction pourrait en outre permettre de coupler le NER à la division cellulaire.

Le complexe UV-DDB, quant à lui, est formé des protéines DDB1 (de l'anglais *DNA damage binding protein 1*, 127 kDa) et DDB2 (ou XPE, 48 kDa). Le complexe UV-DDB purifié présente une affinité pour les CPD, les 6-4 PP, les sites abasiques mais également pour les mésappariements de 2 à 3 bases (Wittschieben et al., 2005). UV-DDB n'est pas requis pour le NER *in vitro*, mais une mutation dans le gène *XPE* entraîne une prédisposition au cancer de la peau associée à un défaut de réparation des CPD chez l'homme (Hwang et al., 1999). La protéine XPE est induite par les UV d'une façon dépendant de la protéine p53. De plus, elle co-localise *in vivo* avec les sites de dommages de l'ADN créés par les UV, avec une légère préférence pour les 6-4 PP (Fitch et al., 2003). Le complexe UV-DDB est associé,

Introduction

indépendamment de la protéine CSA, à la ligase d'ubiquitine Cul4A et au CSN (Groisman et al., 2003; Kulaksiz et al., 2005). Il interagit également avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (Datta et al., 2001).

Le facteur UV-DDB facilite la reconnaissance de certaines lésions par le complexe XPC/HR23B, en particulier dans un contexte chromatinien. En effet, le complexe XPC/HR23B présente une affinité plus faible pour les CPD que pour les 6-4 PP (Batty et al., 2000; Sugasawa et al., 2001). La sur-expression de la protéine XPE augmente l'affinité du complexe XPC/HR23B pour les CPD (Fitch et al., 2003). De plus, UV-DDB par son interaction avec Cul4A participe aux modifications post-traductionnelles de la protéine XPC après exposition aux UV (Kulaksiz et al., 2005; Sugasawa et al., 2005; Wang et al., 2005b). La protéine XPE est elle-même une cible de Cul4A. La protéine XPE ubiquitinylée est dégradée, alors que la protéine XPC ubiquitinylée ne l'est pas, vraisemblablement stabilisée par son interaction avec HR23B. Ce jeu complexe de dégradation/stabilisation régule la reconnaissance des CPD par XPC *in vivo* (El-Mahdy et al., 2006).

B) Formation du complexe de pré-incision

Le complexe de pré-incision regroupe des facteurs qui vont permettre d'ouvrir la double hélice d'ADN au site de dommage, de protéger le brin intact et d'assurer un recrutement correct des protéines chargées de l'excision du fragment portant la lésion.

Recrutement du complexe TFIIH

Le facteur de transcription IIH (TFIIH) est composé de 10 protéines, impliqué non seulement dans le NER mais aussi dans l'initiation de la transcription par l'ARN pol II et dans le contrôle du cycle cellulaire (pour revue voir Svejstrup et al., 1996). Il possède une structure en forme de bague mise en évidence par la microscopie électronique. Le cœur du complexe est formé des protéines p34, p44, p52, p62, XPB et de la protéine p8 (ou TFB5) récemment

Introduction

mise en évidence (Giglia-Mari et al., 2004). La protéine XPD assure la connexion entre ce cœur et la sous-unité CAK (de l'anglais *cdk-activating kinase*) contenant les protéines cdk7, cycline H et MAT1. La sous-unité CAK n'est pas requise pour le NER *in vitro*.

Les protéines XPB et XPD présentent des activités hélicase et ATPase dépendant de l'ADN. Alors que la protéine XPB déroule l'ADN dans le sens 3'→5', la protéine XPD agit dans la direction opposée. L'action de ces deux hélicases en présence d'ATP augmentent l'ouverture de la double hélice autour de la lésion (Tapias et al., 2004).

Recrutement du complexe XPA/RPA

L'ouverture créée par TFIIH est stabilisée par la protéine XPA. La protéine XPA est une protéine de 32 kDa qui présente une affinité pour les distorsions de la double hélice d'ADN. Elle interagit avec la protéine RPA (de l'anglais *replication protein A*). RPA est un complexe formé de trois sous-unités de 14, 32 et 70 kDa et présentant une forte affinité pour l'ADN simple-brin. La protéine RPA protège le brin monocaténaire non endommagé qui sert de matrice pour la phase de re-synthèse du NER et stabilise l'interaction de la protéine XPA avec l'ADN.

De part son affinité pour les lésions de l'ADN créées par les UV, la protéine XPA a longtemps été considérée comme la protéine de reconnaissance des dommages du NER. Il semblerait que le processus de reconnaissance se fasse en deux étapes (Sugasawa et al., 2001; You et al., 2003). L'étape initiale est assurée par les complexes XPC/HR23B et UV-DDB et la protéine XPA confirme la présence de la lésion ce qui permet la poursuite du NER par le recrutement de la nucléase XPF/ERCC1 et l'activation de la nucléase XPG (Volker et al., 2001). Le recrutement du complexe XPA/RPA au site de dommage entraînerait l'éviction du complexe XPC/HR23B, sans doute à travers de modifications post-traductionnelles de la protéine XPC (Wang et al., 2005b; You et al., 2003).

Introduction

Recrutement de l'endonucléase XPG

Le complexe de pré-incision est complété par la protéine XPG dont le recrutement est indépendant de la présence de la protéine XPA (Volker et al., 2001). XPG est une endonucléase 3' appartenant à la même famille que la protéine FEN-1 qui reconnaît et dégrade les structures flottantes d'ADN (*flap endonuclease*). Son activité nucléasique n'est nécessaire qu'à l'étape d'incision proprement dite, cependant sa présence, ainsi que celle du complexe XPA/RPA, est requise pour que l'ouverture de la double hélice d'ADN soit optimale (Tapias et al., 2004).

C) Incision du fragment endommagé

L'incision du brin d'ADN contenant la lésion nécessite la coopération de deux nucléases : la protéine XPG et le complexe XPF/ERCC1. XPF et ERCC1 sont des protéines de 103 et 33 kDa respectivement. Le complexe XPF/ERCC1 constitue une endonucléase 5' également impliquée dans la réparation des pontages intra-brins, dans la recombinaison homologe et dans la maintenance des télomères (Motycka et al., 2004; Niedernhofer et al., 2004).

Le recrutement du complexe XPF/ERCC1 et l'activation de la protéine XPG nécessitent la présence de la protéine XPA (Volker et al., 2001). Les complexes XPC/HR23B et TFIIH permettraient d'orienter correctement l'incision par les nucléases du NER (Tapias et al., 2004). Le recrutement des protéines XPG et XPF entraînent la dissociation des complexes XPC/HR23B et TFIIH respectivement (Riedl et al., 2003). La protéine XPG incise le brin endommagé de 2 à 8 nucléotides en 3' de la lésion. Le complexe XPF/ERCC1, lui, agit en 5' de 15 à 24 nucléotides en aval de la lésion.

D) Etape de re-synthèse et ligation

L'incision en 5' par le complexe XPF/ERCC1 laisse un groupe hydroxyle à l'extrémité 3' de l'ADN, ce qui permet d'assurer la re-synthèse du fragment excisé sans modifications

Introduction

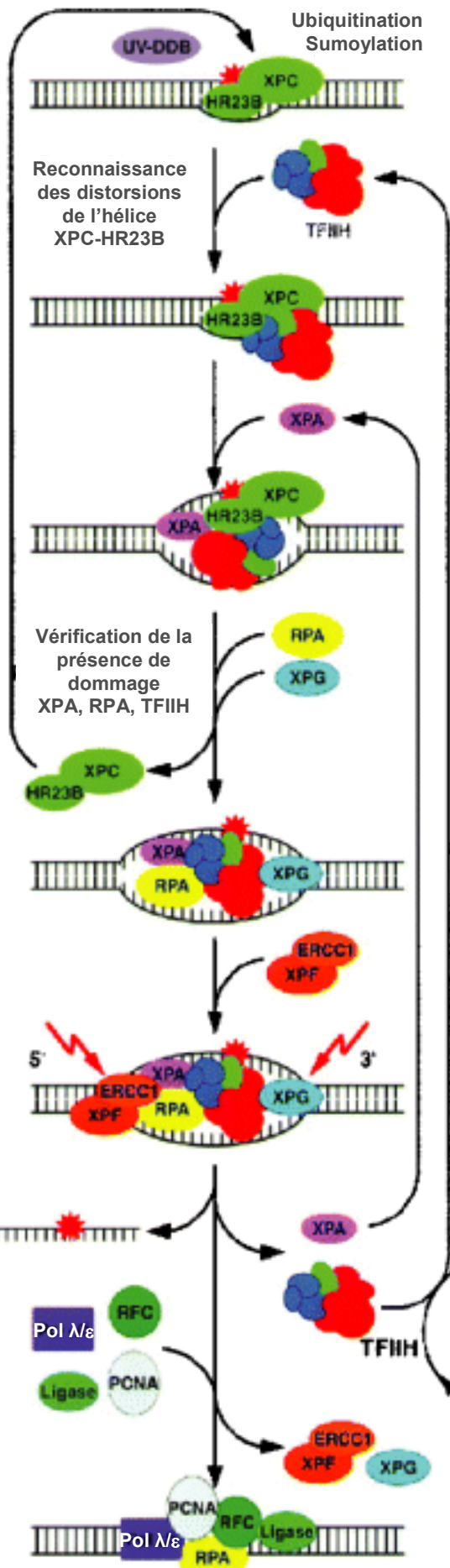
supplémentaires. La protéine RPA assure la protection du brin modèle et promeut l'assemblage de la machinerie de réplication. Elle est la seule protéine du complexe d'incision à rester sur l'ADN après l'incision (Riedl et al., 2003).

In vitro, les polymérases δ et ϵ sont capables d'assurer l'étape de synthèse du NER en présence de l'anneau de processivité PCNA (de l'anglais *proliferating cell nuclear antigen*) et de son facteur de processivité RFC (de l'anglais *replication factor C*). Cette phase de synthèse d'ADN est mise à profit dans le test de détection du NER appelé UDS (de l'anglais *unscheduled DNA synthesis*). L'étape finale du NER permet la ligature de l'extrémité 5' du brin néo-synthétisé à la séquence d'origine. Elle est assurée par la ligase I.

Figure 2: Modèle du GGR. La lésion entraîne une déformation de la double hélice d'ADN détectée par le complexe XPC/HR23B en association avec le complexe UV-DDB. La détection de la lésion est associée à des modifications post-traductionnelles de ces deux complexes. XPC/HR23B recrute le complexe TFIIH, complexe également impliqué dans la transcription. Les hélicases XPB et XPD assurent l'ouverture de la double hélice ce qui permet le recrutement des protéines XPA, RPA et XPG. La protéine XPA confirme la présence de la lésion et entraîne la poursuite du processus de réparation en permettant l'activation de la protéine XPG et le recrutement du complexe XPF/ERCC1. Le brin endommagé est clivé par l'action concertée des nucléases XPG et XPF/ERCC1. Seule la protéine RPA reste alors au site de lésion et participe à l'étape de re-synthèse du brin excisé assurée par pol δ/ϵ . Cette étape nécessite le PCNA et son facteur de processivité RFC. La ligature finale est effectuée par la ligase I (d'après Park and Choi, 2006).

Introduction

Reconnaissance des dommages
Assemblage du complexe NER



Incision
Excision du dommage

Synthèse de réparation
Ligature

I.3. Cinétique de réparation des dommages pris en charge par le NER

Le NER présente différentes cinétiques de réparation selon le type de dommage et sa localisation dans le génome (Costa et al., 2003).

A) Réponse bi-phasique

L'analyse de la réparation des dommages induits par le N-acétoxy-2-acétylamino-fluorène (NA-AAF), un agent chimique formant de gros adduits sur l'ADN, met en évidence le caractère bi-phasique du NER. Une phase rapide prend en charge 40 à 50% des lésions dans les 6 à 8 premières heures suivant l'exposition. Les lésions résiduelles sont prises en charge par une phase plus lente et la réparation n'est achevée que 48 heures après exposition (van Oosterwijk et al., 1998; van Oosterwijk et al., 1996).

B) Type de dommage

Des deux lésions majeures induites par les UV, les 6-4 PP sont réparés plus rapidement que les CPD. En effet, 4 heures après exposition aux UV, 100% des 6-4 PP ont été réparés alors qu'il reste plus de 50% des CPD (Riou et al., 1999). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les 6-4 PP induisent des distorsions plus importantes que les CPD et seraient ainsi plus facilement reconnus par les protéines du NER.

C) Localisation dans le génome

Les lésions situées dans le brin codant d'un gène en cours de transcription sont réparées plus rapidement que les autres. Ainsi, 8 heures après irradiation aux UV, 80% des CPD sont réparés dans le brin transcrit contre seulement 15 à 30% dans le brin non transcrit du même gène (Mellon et al., 1987).

I.4. Réplication trans-lésionnelle

La présence d'une lésion de l'ADN peut ralentir ou bloquer la progression des fourches de réplication. Les cellules disposent de polymérases spécialisées dans la réplication à travers une lésion (TLS de l'anglais *translesion synthesis*). La plupart des polymérases trans-lésionnelles appartiennent à la famille des polymérases Y et assurent la réplication de différentes lési

ons (pour revue voir Lehmann, 2005).

En ce qui concerne les dommages de l'ADN créés par les UV, la polymérase η (pol η) purifiée est capable de répliquer un fragment d'ADN contenant un CPD et insère généralement une base correcte en face de la lésion (Masutani et al., 2000). La pol η forme des foyers nucléaires aux sites de réplication de l'ADN durant la phase S et le nombre de cellules présentant ces foyers augmentent après exposition aux UV (Kannouche et al., 2001). L'importance de la pol η dans la réponse aux UV est mise en évidence par l'existence d'une pathologie humaine associée à des mutations de pol η et caractérisée par une sensibilité au rayonnement solaire et une augmentation du risque de cancer (voir I.5). La pol η de souris présente des caractéristiques similaires à la pol η humaine et les souris pol $\eta^{-/-}$ développent des tumeurs après exposition aux UV (Lin et al., 2006).

I.5. Pathologies associées à un défaut du NER

Chez l'homme, trois maladies autosomiques récessives rares sont associées à un défaut d'un des facteurs du NER : la trichothiodystrophie (TTD), le syndrome de Cockayne (CS) et le *xeroderma pigmentosum* (XP) (pour revue voir Cleaver, 2005; de Boer and Hoeijmakers, 2000; Friedberg, 2001; Lehmann, 2003). Ces trois syndromes se caractérisent par une sensibilité au rayonnement solaire mais seuls les patients XP présentent un risque de cancer

Introduction

accru. Les spectres cliniques sont étendus, variant suivant le gène touché et la sévérité de la mutation. Certains patients présentent des formes mixtes de XP et CS (XP/CS) ou de XP et TTD (XP/TTD). Les mutations trouvées chez les patients souffrant d'un défaut du NER sont regroupées dans une base de données accessible sur le site Internet <http://xpmutations.org>.

A) *La trichothiodystrophie*

La TTD se caractérise par des cheveux cassants (à cause d'un déficit en acides aminés souffrés), une ichtyose (maladie de peau se caractérisant par une extrême sécheresse et la présence de squames ressemblant à des écailles de poisson), un retard mental, une hypofertilité et un nanisme (pour revue voir Itin et al., 2001). Ce syndrome au spectre clinique très hétérogène regroupe des maladies comme les syndromes de Pollitt, de Tay, de Sabinas, de Marinseco-Sjögren ou le syndrome des cheveux cassants amish.

La majorité des patients TTD sont sensibles aux UV. Cette photosensibilité s'explique par une mutation dans un des trois gènes suivants : *XPD*, *XPB* ou *p8* (Giglia-Mari et al., 2004). Les produits de ces trois gènes appartiennent au complexe TFIIH, impliqué à la fois dans le NER et dans la transcription.

B) *Le syndrome de Cockayne*

Les patients CS présentent une photosensibilité cutanée et leurs cellules sont sensibles à de nombreux agents génotoxiques dont les UV. Le syndrome inclut un retard physique et mental (Nance and Berry, 1992). En effet, les patients présentent un développement squelettique anormal (tête d'oiseau, caries dentaires, ostéoporose...), une forme de nanisme, un défaut de la maturation sexuelle et un développement psychomoteur affecté par une dégénérescence neuronale précoce et progressive. En outre, le CS est associé à une perte de l'audition, un visage parcheminé, des cheveux fins et des atteintes oculaires (rétinopathie pigmentaire, cataracte). Les signes cliniques apparaissent généralement dans les premières années de la vie

Introduction

mais, dans les cas les plus sévères, ils sont déjà présents à la naissance. L'espérance de vie moyenne est de 12,5 ans et les causes principales de mort sont la pneumonie et les infections des voies respiratoires. Il existe deux groupes de complémentation : CS-A et CS-B. Les protéines CSA et CSB sont impliquées dans le TCR, mais également dans la transcription, ce qui peut expliquer qu'on ne retrouve pas tous les symptômes de CS dans des syndromes associés à un défaut de l'ensemble du NER.

En cas de défaut du TCR, le blocage persistant de l'ARN pol II aux sites de dommages pourrait constituer un signal pro-apoptotique. En effet, les cellules murines ou humaines déficientes en TCR présentent un niveau d'apoptose après exposition aux UV plus important que les cellules déficientes en GGR (McKay et al., 2001; van Oosten et al., 2000). Cette particularité est avancée pour expliquer deux caractéristiques de CS : la dégénérescence neuronale et l'absence de cancer. Le niveau élevé du métabolisme oxydatif observé dans les neurones pourrait constituer une source de dommages bloquant la transcription ce qui expliquerait la dégénérescence neuronale observée dans le CS. D'autre part, cette propension des cellules CS à l'apoptose semble compenser l'augmentation de la mutagenèse liée au défaut de TCR, expliquant pourquoi les patients CS, malgré une sensibilité accrue aux UV, ne développent pas de cancers.

C) Xeroderma pigmentosum

La peau parcheminée (*xeroderma*) et les défauts de pigmentation (*pigmentosum*) au niveau des zones exposées au soleil sont les signes principaux de XP. L'exposition au soleil entraîne une dégénérescence progressive de la peau et des yeux avec apparition des premiers symptômes vers l'âge de 2 ans. Contrairement aux patients TTD ou CS, les patients XP présentent un risque accru de développer des cancers de la peau au niveau des zones exposées au soleil (1000 fois supérieur à celui de la population générale). Il s'agit principalement de carcinomes des cellules basales et de carcinomes squameux et, plus rarement, de mélanomes

Introduction

(Daya-Grosjean and Sarasin, 2005). L'âge moyen d'apparition de la première tumeur se situe à 8 ans, soit 50 ans avant la population générale. De plus, 18% des patients XP présentent des défauts neurologiques liés à une dégénérescence neuronale primaire. En plus des cancers de la peau, les patients XP ont un risque augmenté de 10 à 20 fois de développer des cancers internes avant l'âge de 20 ans. L'incidence de cette maladie varie de 1 / 250 000 dans les pays occidentaux à 1 / 40 000 au Japon et en Afrique du nord (pour une revue de cas cliniques voir Kraemer et al., 1987).

Des expériences de fusions cellulaires ont déterminé sept groupes de complémentation (XP-A à XP-G) parmi les patients XP présentant un défaut du NER. Les sept protéines correspondantes (XPA à XPG) sont impliquées dans les différentes étapes du NER décrites ci-dessus. La perte de fonction d'un huitième gène (*POLH*) entraîne un variant de XP (XP-V) qui n'est pas associé à un défaut du NER mais à un défaut de la TLS. Dans les cellules de patients XP-V, d'autres polymérases fautives peuvent se substituer à pol η pour assurer la TLS. Des mécanismes alternatifs de recombinaison ont également été proposés pour prendre en charge le blocage des fourches de réplication aux sites de dommage (Limoli et al., 2005).

L'hétérogénéité génétique de XP conduit à une grande hétérogénéité clinique. Un défaut exclusif du GGR (XP-C ou XP-E) ou de la TLS (XP-V) n'est généralement pas associé à une dégénérescence neuronale et les patients XP-C et XP-V présentent des caractéristiques cliniques similaires. La plupart des mutations identifiées dans le gène *XPC* entraînent une troncature importante de la protéine avec une perte de fonction. Les mutations du gène *XPC* sont parmi les plus fréquentes chez les patients XP. Les atteintes associées à une mutation du gène *XPE* sont en général modérées. Les cellules de patients XP-E présentent un niveau de synthèse de réparation correspondant à 50 à 80% de celui de cellules normales. Une mutation dans le gène *XPA* affecte l'ensemble du NER. Les patients XP-A présentent une sensibilité aux UV plus importante que les patients XP-C. On trouve peu de patients XP-F. Leurs

Introduction

symptômes sont en général modérés. Les mutations plus invalidantes ne seraient pas compatibles avec la vie. De même, l'activité hélicase de la protéine XPB étant indispensable à l'initiation de la transcription, on trouve peu de patients XP-B. Les mutations du gène *XPB* sont plus nombreuses. Chez les patients XP-D, ces mutations n'affectent que l'activité hélicase de la protéine XPD ou sa stimulation par l'interaction avec la protéine p44 du complexe TFIIH. Cependant, la protéine XPD est également impliquée dans la TTD. Dans ce cas, les mutations observées affectent la transcription *in vitro*. Une mutation du gène *XPB*, *XPD* ou *XPG* peut être associée à XP, ou une atteinte mixte XP/CS ou XP/TTD. Les mutations du gène *XPG* sont rares mais leurs conséquences sont sévères, avec généralement une combinaison de symptômes XP et CS.

Le NER constitue donc une voie de réparation prenant en charge une grande variété de lésions de l'ADN. De plus, certains de ses facteurs sont impliqués dans le processus cellulaire majeur qu'est la transcription. Ces caractéristiques permettent de comprendre la complexité et la sévérité des pathologies associées à un défaut d'une des protéines du NER.

II. La réparation des cassures double-brin de l'ADN par le NHEJ

Les DSB sont particulièrement dangereuses pour la cellule car les deux brins de la double hélice sont affectés. Elles peuvent conduire à la perte d'information génétique ou à des réarrangements chromosomiques entraînant la mort cellulaire ou l'apparition de cancers. La cellule dispose de deux mécanismes principaux de réparation des DSB : la RH et le NHEJ. Le NHEJ, à la différence de la RH, ne nécessite pas la présence d'homologies de séquence pour opérer et peut prendre place dans toutes les phases du cycle cellulaire (Rothkamm et al., 2003). Le NHEJ est également impliqué dans la recombinaison V(D)J, un mécanisme essentiel dans le développement du système immunitaire (pour revue voir Lieber et al., 2004). Au moins quatre étapes sont nécessaires à la réparation d'une DSB par NHEJ : (i) reconnaissance de la cassure ; (ii) alignement des extrémités ; (iii) modification des extrémités pour qu'elles puissent être liguées et (iv) ligature proprement dite. Ce mécanisme met en jeu plusieurs protéines et certaines étapes restent à caractériser (pour revue voir Hefferin and Tomkinson, 2005; Lieber et al., 2003; Weterings and van Gent, 2004). La voie NHEJ est conservée au cours de l'évolution et elle opère également chez les procaryotes (pour revue voir Bowater and Doherty, 2006). Il existe cependant des différences entre bactérie, levure et eucaryotes supérieurs. Nous nous intéresserons principalement aux mécanismes du NHEJ dans les cellules d'eucaryotes supérieurs.

II.1. Les cassures double-brin de l'ADN : production, signalisation et réparation

A) *Origine des DSB*

Les DSB peuvent être des effets collatéraux du métabolisme cellulaire. Nous avons vu que les ROS peuvent induire une grande variété de lésions de l'ADN dont des DSB. Les DSB peuvent également être formées indirectement, au cours de la réplication d'une SSB non réparée, par la proximité de deux SSB ou au cours d'un processus de réparation. Le nombre de DSB endogènes liées à la réplication dans des cellules normales est estimé à 10 à 50 par cellule et par cycle (Haber, 1999; Vilenchik and Knudson, 2003). Certaines DSB que l'on peut qualifier de « programmées », constituent des intermédiaires de processus cellulaires normaux. C'est le cas des DSB créées lors de la recombinaison méiotique, de la différenciation des lymphocytes (recombinaison V(D)J) et durant la recombinaison des immunoglobulines (CSR de l'anglais *class-switch recombination*). L'action des topoisomérases de type II (topoII) entraîne également la formation transitoire de DSB destinées à relaxer la double-hélice d'ADN pour permettre la réplication, la recombinaison, la transcription et la ségrégation des chromosomes. Les DSB programmées ne sont donc pas dangereuses en elles-mêmes mais peuvent le devenir si les processus au cours desquels elles sont formées ne se déroulent pas correctement. Enfin, la cellule dispose d'un système de protection des extrémités de ses chromosomes afin d'empêcher leur prise en charge par les voies de réparation. Cependant, en cas de faille de ce système ou si le raccourcissement des télomères est trop important, les extrémités peuvent être considérées comme des DSB à réparer, ce qui entraîne des fusions délétères pour la cellule.

Différents agents génotoxiques induisent des DSB. Parmi ceux-ci, certains nécessitent un processus cellulaire comme la réplication. Les RI produisent une grande variété de dommages

Introduction

incluant oxydation, SSB et DSB. Les DSB produits par les RI présentent une grande complexité. Elles sont induites directement par dépôt d'énergie ou indirectement par la génération de ROS. Ils existent des agents chimiques mimant les effets des RI tels la bléomycine, la néocarzinostatine (NCS) et la calicheamicine (CAL). La NCS et la CAL appartiennent à la famille des enediynes et induisent des DSB de façon plus spécifique que les RI (Yu et al., 1994). Par exemple, le ratio DSB : SSB est de 1 : 3 pour la CAL contre 1 : 20 pour les RI (Elmroth et al., 2003). Les inhibiteurs des topoisomérases comme l'étoposide (VP16) ou la camptothécine (CPT) bloquent le complexe ADN/topoisomérase et conduisent à la formation d'une DSB lors de la réplication.

B) Voies activées par les DSB

Les DSB peuvent induire des mécanismes cellulaires allant au-delà des processus de réparation proprement dits. Ces mécanismes mettent en jeu des protéines de détection des dommages (complexe Mre11/Rad50/Nbs1, Ku), des protéines de transduction (kinases ATM, ATR et DNA-PKcs) et des protéines effectrices (protéines de la réparation, du contrôle du cycle cellulaire ou de l'apoptose) (pour revue voir O'Driscoll and Jeggo, 2006; Valerie and Povirk, 2003).

La voie de signalisation principale activée par les RI est celle dépendant de la kinase ATM (*ataxia telangiectasa mutated*). Cette protéine est mutée dans le syndrome humain d'*ataxia telangiectasa* (AT). Les cellules AT sont radiosensibles. Le complexe Mre11/Rad50/Nbs1 (complexe MRN) serait responsable de l'activation et/ou du recrutement d'ATM aux sites de DSB (Falck et al., 2005). Les DSB entraînent la phosphorylation de l'histone H2AX, l'histone phosphorylé étant nommé γ -H2AX (Rogakou et al., 1998). Cette phosphorylation, assurée de façon redondante par les kinases ATM et DNA-PKcs (Burma et al., 2001; Stiff et al., 2004), s'étend sur des mégabases autour de la lésion et produit des foyers intranucléaires ponctuels détectable par immunocytochimie. De nombreuses protéines comme TP53BP1 (*tumor protein*

Introduction

53 binding protein 1), MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*), BRCA1 (*breast cancer associated protein 1*) et le complexe MRN se localisent au niveau des ces foyers (Paull et al., 2000; Stewart et al., 2003; Wang et al., 2002). La kinase ATR (*ATM Rad3-related protein*) est activée par les régions d'ADN simple-brin de façon dépendant de la protéine ATRIP (*ATR interacting protein*) et est au cœur de la réponse cellulaire aux UV. Cependant, la kinase ATR est également activée par les DSB de façon dépendant d'ATM, de NBS1 et de l'activité nucléasique de Mre11. Le rôle d'ATR dans la réponse aux RI est limité aux phases S et G2 du cycle cellulaire et est régulé par les cyclines dépendant des kinases (CDK) (Jazayeri et al., 2006). La voie ATR pourrait être impliquée dans la stabilisation des fourches de réplication ou dans l'activation de la RH.

Ces voies de signalisation vont coordonner la réponse cellulaire à l'irradiation qui regroupe les points de contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation par NHEJ ou RH dans un réseau complexe (Tableau 3 et Figure 3). Des mutations d'une des protéines impliquées dans ces voies sont retrouvées dans certaines pathologies humaines.

Origine des DSB	Nature des DSB	Voies impliquées
RI	DSB de grande complexité nécessitant des modifications	Principalement NHEJ et signalisation ATM
DSB endogènes	DSB et dommages des bases et des sucres	NHEJ, signalisation ATM et potentiellement RH
Blocage des fourches de réplication	DSB formées par la régression des fourches	RH et signalisation ATR
Recombinaison V(D)J	Extrémités codantes en épingle à cheveux et extrémités signal franches	NHEJ et signalisation ATM
CSR	Inconnue	NHEJ et signalisation ATM
Méiose	DSB induite par une enzyme et contenant probablement des extrémités directement liables	RH, ATM, ATR, complexe MRN DNA-PKcs ¹ ?
Télomères	Les télomères non protégés peuvent être considérés comme des DSB	NHEJ

Tableau 3 : Origine des cassures double-brin de l'ADN et voies de réponse (d'après O'Driscoll and Jeggo, 2006). ¹ La DNA-PKcs pourrait participer au point de contrôle méiotique comme en témoigne l'augmentation d'apoptose spontanée des spermatocytes dans la souris SCID (déficiente en DNA-PKcs) (Hamer et al., 2003).

Introduction

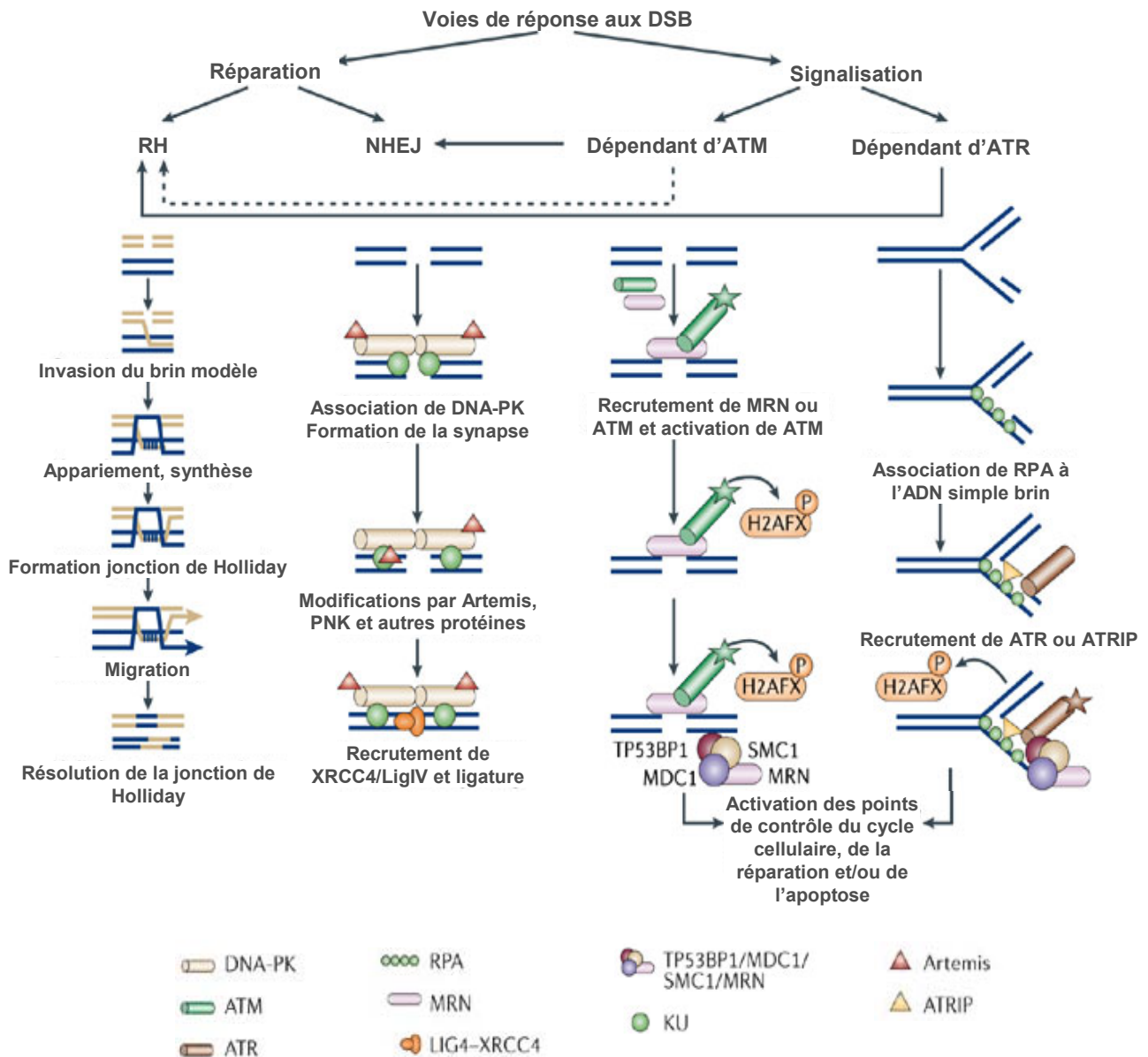


Figure 3: Mécanismes de détection et de réparation des cassures double-brin de l'ADN. (a) La recombinaison homologue (RH) a lieu dans les phases S et G2 du cycle cellulaire quand une séquence homologue est disponible. La formation d'extrémités simple-brin à la cassure est suivie de l'invasion du brin modèle (*strand invasion*) et de la formation d'une jonction de Holliday. Le site lésé est restauré par synthèse d'ADN en utilisant le brin intact comme matrice. La réparation s'achève par la résolution de la jonction de Holliday. La recombinaison non homologue (NHEJ) peut opérer dans toutes les phases du cycle cellulaire. Le recrutement de Ku aux extrémités assure le recrutement et l'activation de la DNA-PKcs. Les extrémités sont modifiées par des nucléases comme Artemis et/ou des polymérases avant la ligature effectuée par le complexe XRCC4/LigIV. La voie dépendant de la kinase ATM est la voie de signalisation majeure impliquée dans la réponse aux DSB. La voie dépendant de la kinase ATR n'intervient que tardivement après RI. Un événement précoce de la réponse aux DSB est la phosphorylation de l'histone H2AX suivi du recrutement aux sites de dommages des protéines TP53BP1, MDC1 SMC1 et du complexe MRN. (d'après O'Driscoll and Jeggo, 2006).

Introduction

C) Contribution du NHEJ et de la RH au maintien de l'intégrité génétique

Les étapes du NHEJ seront décrites en détail dans les sections II.2 et II.3. La RH est un processus complexe dont la description précise n'entre pas dans le cadre de cette étude (pour une revue détaillée des différents mécanismes de RH voir Helleday, 2003). Brièvement et de façon très simplifiée, elle débute par la résection des extrémités de la cassure, étape assurée par le complexe MRN. La protéine BRCA2 facilite la formation de nucléofilaments de protéine Rad51 sur les extrémités simple-brin ainsi formées et recouvertes par RPA. L'action de Rad51, de ses paralogues et des protéines Rad52 et Rad54 permet l'invasion du brin homologue et la re-synthèse de la région endommagée. La jonction de Holliday ainsi formée est résolue, ce qui achève le processus de réparation (Figure 3) (pour revue voir Hoeijmakers, 2001; Valerie and Povirk, 2003).

La contribution relative de la RH et du NHEJ dans la réparation des DSB chez les eucaryotes supérieurs reste controversée. Cependant, à l'heure actuelle, il est admis que le NHEJ y est le mécanisme prépondérant. Plusieurs hypothèses ont été avancées sur les relations entre NHEJ et RH dans les cellules de mammifères : (i) voies distinctes (Ristic et al., 2003) ; (ii) compétition et/ou compensation (Allen et al., 2003; Allen et al., 2002) ; (iii) collaboration pour la réparation de certaines DSB ou la conservation de l'intégrité génétique dans l'animal (Couedel et al., 2004; Richardson and Jasin, 2000). Récemment, l'analyse du recrutement des protéines de réparation des DSB aux sites de dommages induits par un laser dans des cellules humaines a montré un comportement différentiel du NHEJ et de la RH (Kim et al., 2005). Les protéines du NHEJ sont recrutées précocement et de façon transitoire alors que celles de la RH apparaissent plus tardivement et persistent aux sites de lésions non réparées. Le NHEJ pourrait donc être un mécanisme de réparation immédiat, la RH prenant en charge les cassures résiduelles. Ceci est similaire à des résultats précédemment obtenus chez la levure (Frank-

Introduction

Vaillant and Marcand, 2002). De plus, le NHEJ étant opérationnel dans toutes les phases du cycle cellulaire et la RH étant tributaire de la disponibilité d'une séquence homologue (Rothkamm et al., 2003), la phase du cycle cellulaire influence le choix de la voie de réparation. Chez la levure, la cycline dépendante des kinases CDK1 contrôlerait la résection des extrémités nécessaires à la RH. En phase G1, en l'absence d'activité de CDK1, le NHEJ serait favorisé alors que la RH serait préférée en phase S (Scully and Xie, 2005).

La prédominance du NHEJ chez les eucaryotes supérieurs peut s'expliquer par le fait que leur génome présente de nombreuses séquences répétées (correspondant à 40% du génome chez l'homme). Le recours au NHEJ pourrait permettre de limiter les risques de recombinaison au niveau de ces séquences (Lieber et al., 2003). Comme seul un faible pourcentage du génome code effectivement des protéines, le recours à une voie encline à l'erreur mais rapide comme le NHEJ serait moins dommageable que l'entrée en phase S ou en mitose en présence de cassures non réparées.

II.2. Les protéines impliquées dans le NHEJ

Le corps du complexe de réparation NHEJ, comprenant les protéines Ku70, Ku80, DNA-PKcs, Artemis, XRCC4 et Ligase IV est relativement bien connu. Cependant, en 2006, deux équipes indépendantes ont mis en évidence un nouveau facteur nommé XLF-Cernunnos (Ahnesorg et al., 2006; Buck et al., 2006). D'autres protéines sont soupçonnées de participer au NHEJ, sans que leurs rôles ne soient encore parfaitement déterminés.

A) La protéine kinase dépendant de l'ADN

La protéine kinase dépendant de l'ADN (DNA-PK de l'anglais *DNA-dependent protein kinase*) est une enzyme formée de deux sous-unités dont les protéines appartiennent au groupe

Introduction

XRCC (*X-ray cross complementing*) (pour revue voir Burma and Chen, 2004; Collis et al., 2005; Meek et al., 2004) :

- La sous-unité catalytique est une kinase à sérine/thréonine de 469 kDa nommée DNA-PKcs (XRCC7). Elle appartient à la famille des kinases apparentées à la kinase du phosphatidylinositol (famille PIKK), comme les protéines ATM, ATR, mTOR et TTRAP. Toutes ces protéines sont impliquées dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN ou au stress. Ces kinases sont, en outre, sensibles à la wortmannine. Le motif consensus de la DNA-PKcs est une sérine ou une thréonine suivie d'une glutamine (motif S/T-Q). Cependant, elle est capable de phosphoryler *in vitro* une sérine ou une thréonine suivie d'un acide aminé hydrophobe comme la tyrosine, la leucine ou l'alanine.
- La sous-unité régulatrice, Ku, est constituée des protéines Ku70 et Ku80 (XRCC6 et XRCC5), protéines de 73 et 86 kDa respectivement. Ku présente une forte affinité pour les extrémités d'ADN double-brin. La structure de l'hétérodimère permet l'encerclage de la double hélice d'ADN. La protéine Ku70 est induite après RI de façon dépendant de p53 et de ATM (Brown et al., 2000). L'inositol hexakisphosphate (IP₆) en s'associant à Ku en modifie la conformation (Hanakahi and West, 2002) et stimule le NHEJ dans des extraits de cellules de mammifères (Hanakahi et al., 2000).

Les KO murins d'un des éléments du complexe DNA-PK sont viables mais présentent une immunodéficiences sévère, une radiosensibilité et un défaut de croissance pour les souris Ku70^{-/-} ou Ku80^{-/-} (pour revue voir Dasika et al., 1999). L'inactivation des deux allèles du gène *KU80* dans la lignée humaine HCT 116 (carcinome colorectal) a montré que ce gène est essentiel dans les cellules somatiques humaines. L'inactivation d'un seul allèle entraîne une réduction de la prolifération et une augmentation du nombre de cellules polynucléées et de la radiosensibilité (Li et al., 2002). La seule lignée humaine déficiente en DNA-PKcs connue est

Introduction

issue d'un glioblastome (lignée M059J) (Allalunis-Turner et al., 1993). Sa radiosensibilité est complétée par la réintroduction de l'ADNc du gène *DNA-PKcs* (Hoppe et al., 2000).

Outre leur rôle dans la recombinaison V(D)J et dans le NHEJ, les protéines du complexe DNA-PK interviennent dans d'autres processus cellulaires tels la protection des télomères, la réponse à l'infection, l'apoptose (pour revue voir Burma and Chen, 2004) ou l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire (Muller et al., 2005).

B) Artemis

La protéine Artemis est une nucléase de 77 kDa essentielle au processus de recombinaison V(D)J et appartenant à la famille des métallo- β -lactamases (Moshous et al., 2001). Une fraction est associée à la DNA-PKcs dans un complexe stable. La protéine Artemis purifiée possède une activité exonucléase 5'→3' simple-brin intrinsèque. Phosphorylée par la kinase DNA-PKcs elle acquiert une activité endonucléique 5'→3' et une activité d'ouverture des structures d'ADN en épingles à cheveux (Ma et al., 2002).

L'inactivation du gène *Artemis* dans des cellules embryonnaires de souris entraîne une sensibilisation à la bléomycine et un défaut de l'ouverture des structures en épingles à cheveux lors de la recombinaison V(D)J. De plus, les cellules déficientes en Artemis présentent une augmentation de l'instabilité génétique (Rooney et al., 2003). Chez l'homme, les mutations du gène *Artemis* entraînent une hypersensibilité aux agents inducteurs de DSB et une absence de lymphocytes B et T associé à un défaut de recombinaison V(D)J (syndrome RS-SCID) (Moshous et al., 2001). Cependant, on n'observe pas de défaut majeur de réparation. La protéine Artemis serait impliquée dans la réparation d'un nombre limité (10%) de cassures nécessitant une modification particulière des extrémités et contribuant fortement à la toxicité des RI (Riballo et al., 2004).

C) Le complexe XRCC4/Ligase IV

Le complexe formé par les protéines XRCC4 et Ligase IV (LigIV) est impliqué dans l'étape de ligature du NHEJ. Ces deux constituants sont essentiels, puisque la délétion d'un des deux gènes entraîne une mortalité embryonnaire tardive causée par une dégénérescence neuronale chez la souris (Dasika et al., 1999).

- La LigIV est une protéine de 100 kDa dont l'activité dépend de l'ATP.
- La protéine XRCC4 est une protéine de 38 kDa. XRCC4 est le co-facteur de la LigIV dont il assure l'activation et la stabilisation. En effet, dans les cellules de hamster déficientes en protéine XRCC4, la LigIV n'est pas détectée (Bryans et al., 1999). La protéine XRCC4 est une cible de la DNA-PKcs *in vitro* (Leber et al., 1998). *In vivo*, elle subit de nombreuses modifications suite à l'induction de DSB puisqu'elle est phosphorylée de façon dépendant de DNA-PK, clivée dans les cellules apoptotiques et ubiquitinylée (Foster et al., 2006; Matsumoto et al., 2000). De plus, la protéine XRCC4 humaine est sumoylée de façon transitoire en absence de dommages. Cette modification post-traductionnelle régule sa localisation nucléaire et influence la radiosensibilité et la réparation des DSB (Yurchenko et al., 2006).

Les protéines LigIV et XRCC4 forment un complexe stable. La stoechiométrie de ce complexe est controversée. Certains auteurs proposent un tétramère dont le coeur serait constitué de deux protéines XRCC4 chacune flanquée d'une protéine LigIV (Lee et al., 2000). D'autres privilégient un complexe formé d'une LigIV associé à un dimère de XRCC4 (Sibanda et al., 2001). XRCC4 est également trouvé sous forme de tétramères incompatibles avec sa fonction dans le NHEJ (Modesti et al., 2003). Ces hypothèses sont complétées par la récente découverte de la protéine XLF-Cernunnos, un nouveau partenaire de XRCC4 (voir ci-dessous).

Introduction

D) *XLF-Cernunnos*

Le facteur du NHEJ XLF-Cernunnos a été découvert par deux approches différentes en 2006. L'analyse de cellules de patients présentant un retard de croissance, une microcéphalie et une immunodéficience a révélé une radiosensibilité associée à un défaut de la recombinaison V(D)J et du NHEJ. Ces patients présentent une mutation dans le gène *XLF-CERNUNNOS*. La complémentation par l'ADNc de *XLF-CERNUNNOS* restaure les capacités de NHEJ *in vitro* (Buck et al., 2006). Une autre équipe a mis en évidence la protéine XLF-Cernunnos en cherchant des partenaires de la protéine XRCC4 par la méthode du double-hybride (Ahnesorg et al., 2006). XLF-Cernunnos est une protéine de 33 kDa qui présenterait une homologie structurelle avec XRCC4. Elle interagit directement avec le complexe XRCC4/LigIV *in vitro* et *in vivo*. Son inactivation par interférence ARN conduit à une augmentation de la radiosensibilité et à un défaut de NHEJ. XLF-Cernunnos est homologue à la protéine Nej1, impliquée dans le NHEJ chez la levure (Callebaut et al., 2006). Le rôle exact de XLF-Cernunnos, tout comme celui de Nej1, n'est pas encore connu. XLF-Cernunnos pourrait jouer un rôle dans la liaison du complexe XRCC4/LigIV avec l'ADN. De plus, elle pourrait influencer l'équilibre entre dimères et tétramères de XRCC4, contrôlant ainsi l'activité de LigIV. Enfin, elle pourrait réguler l'accès du complexe XRCC4/LigIV aux lésions de l'ADN.

E) *Autres activités impliquées dans le NHEJ*

Au vu de la variété des agents induisant des DSB, il est clair qu'il existe de nombreuses configurations d'extrémités d'ADN à réparer. Les extrémités non complémentaires ou endommagées, induites par exemple par les RI, doivent être modifiées pour pouvoir être liguées. Pour cela, trois types d'activités enzymatiques sont nécessaires : (i) addition ou retrait d'un groupe phosphate aux extrémités par une kinase ou une phosphatase et éventuellement suppression de fragments de sucres ; (ii) digestion d'extrémités simple-brin par une nucléase et/ou (iii) addition de nucléotides par une polymérase.

Introduction

Kinases et phosphatases

La polynucléotide kinase (PNK) est un candidat intéressant puisqu'elle présente à la fois une activité 5'-kinase et 3'-phosphatase. Dans des extraits de cellules humaines, la conversion d'extrémités 5'-OH en extrémités 5'-phosphate liables est catalysée par la PNK, à la condition que la voie NHEJ soit active (Chappell et al., 2002).

Les RI induisent la fragmentation des sucres de l'ADN et les extrémités 3' peuvent être bloquées par des fragments de déoxyribose, en général des 3'-phosphoglycolates (3'-PG). Les enzymes APE1 (*apurinic/apyrimidic endonuclease 1*) et TDP1 (*tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*) sont capables de supprimer les 3'-PG aux extrémités des DSB (Parsons et al., 2004; Raymond et al., 2005). Si l'endonucléase APE1 n'agit que sur les extrémités franches et 3' entrantes, la protéine TDP1 a une préférence pour les extrémités 3' sortantes mais laisse un groupe phosphate en 3'.

Nucléases

D'autres nucléases que la protéine Artemis sont soupçonnées de participer au NHEJ. Le complexe MRN présente, à travers la protéine Mre11, une activité nucléasique. Le fractionnement d'extraits nucléaires de cellules humaines HeLa (carcinome du col utérin) a mis en évidence une activité NHEJ dépendant de l'addition de LigIV/XRCC4 et qui co-purifie avec le complexe MRN (Huang and Dynan, 2002). Chez les vertébrés, il n'est pas encore prouvé que le complexe MRN agisse directement dans la réparation NHEJ. Le complexe équivalent est nécessaire au NHEJ chez *S. cerevisiae* mais pas chez *S. pombe* (Chen et al., 2001a), ce qui révèle la complexité de ce mécanisme de réparation.

L'hélicase WRN, dont les mutations chez l'homme entraînent un syndrome caractérisé par une instabilité génétique et l'apparition précoce de pathologies liées au vieillissement (syndrome de Werner, WS), possède une activité exonucléase 3'→5'. Son rôle dans le NHEJ est hypothétique, mais WRN est stimulée par le complexe Ku (Karmakar et al., 2002) et peut

Introduction

déplacer la protéine DNA-PKcs des extrémités de l'ADN (Li and Comai, 2002). De plus, les jonctions d'extrémités non complémentaires obtenues dans des fibroblastes de patients WS présentent de larges délétions (Oshima et al., 2002).

La protéine FEN-1 est une *exo/endonucléase* spécifique des structures flottantes 5'. La délétion de l'homologue de FEN-1 chez *S. cerevisiae* (RAD27) entraîne une réduction de 4,4 fois des événements de jonction impliquant des structures flottantes 5' d'un substrat introduit dans la levure (Wu et al., 1999). Chez les mammifères, la nucléase FEN-1 a été impliquée dans des événements de réparation basés sur l'utilisation de petites homologies (Gottlich et al., 1998; Liang et al., 2005).

Polymérase

Plusieurs polymérase sont candidates pour l'addition de nucléotides au cours du NHEJ :

- La déoxynucléotidyltransférase terminale (TdT) est une enzyme spécifique des lymphocytes, ce qui indique que son activité serait plutôt nécessaire à la recombinaison V(D)J qu'au NHEJ. La TdT ajoute des déoxyribonucléotides, avec une préférence pour les G, aux extrémités 3'-OH de n'importe quel ADN simple ou double brin. Lors de la recombinaison V(D)J, l'addition de nucléotides aux extrémités codantes par la TdT participe grandement à la diversité du système immunitaire. TdT interagit avec le complexe DNA-PK et co-localise avec le complexe Ku aux sites de DSB (Mahajan et al., 1999).
- La polymérase μ (pol μ) présente une similarité de séquence et de structure avec la TdT (Aoufouchi et al., 2000). Elle est induite après RI et co-localise avec γ -H2AX. De plus, en protéines purifiées, pol μ interagit avec Ku et n'est recrutée sur l'ADN qu'en présence de Ku et du complexe XRCC4/Ligase IV. Enfin, pol μ facilite la réparation des DSB *in vitro* (Mahajan et al., 2002). Les souris pol $\mu^{-/-}$ ne sont pas sensibles aux RI mais présentent un défaut de développement des lymphocytes B (Bertocci et al., 2003).

Introduction

- La polymérase λ (pol λ) est la polymérase de mammifères la plus proche de la polymérase Pol4 impliquée dans le NHEJ chez *S. cerevisiae*. La déplétion de pol λ dans des extraits de cellules HeLa inhibe l'activité de remplissage des discontinuités et la ligature des extrémités d'ADN *in vitro* (Lee et al., 2004). La sur-expression d'une forme catalytiquement inactive de pol λ dans des cellules de hamster affecte l'efficacité de réparation de DSB créées par l'enzyme I-SceI et ce défaut s'accompagne d'une sensibilisation aux RI (Capp et al., 2006).

Analysées dans un même système *in vitro*, pol μ et pol λ présentent des capacités équivalentes de réparation d'un substrat aux extrémités partiellement cohésives, suggérant une fonction redondante dans le NHEJ. Cependant, contrairement à la TdT, pol μ et pol λ ont besoin de suivre un brin modèle. Seule pol μ peut assurer l'incorporation de nucléotides sans que l'amorce soit appariée au modèle (Nick McElhinny et al., 2005).

II.3. Modèle(s) du NHEJ

A) NHEJ dépendant de DNA-PK

Dans ce modèle, la réparation des DSB nécessite la présence des complexes DNA-PK et XRCC4/LigIV. C'est le modèle communément admis. L'état actuel des connaissances, issues de nombreuses études génétiques et biochimiques, permet d'en dresser un schéma (Figure 4). Ce modèle est certainement très simplifié par rapport à ce qui se passe dans la cellule. En particulier, nous ne discuterons pas des modifications de la chromatine nécessaires au processus de réparation.

Introduction

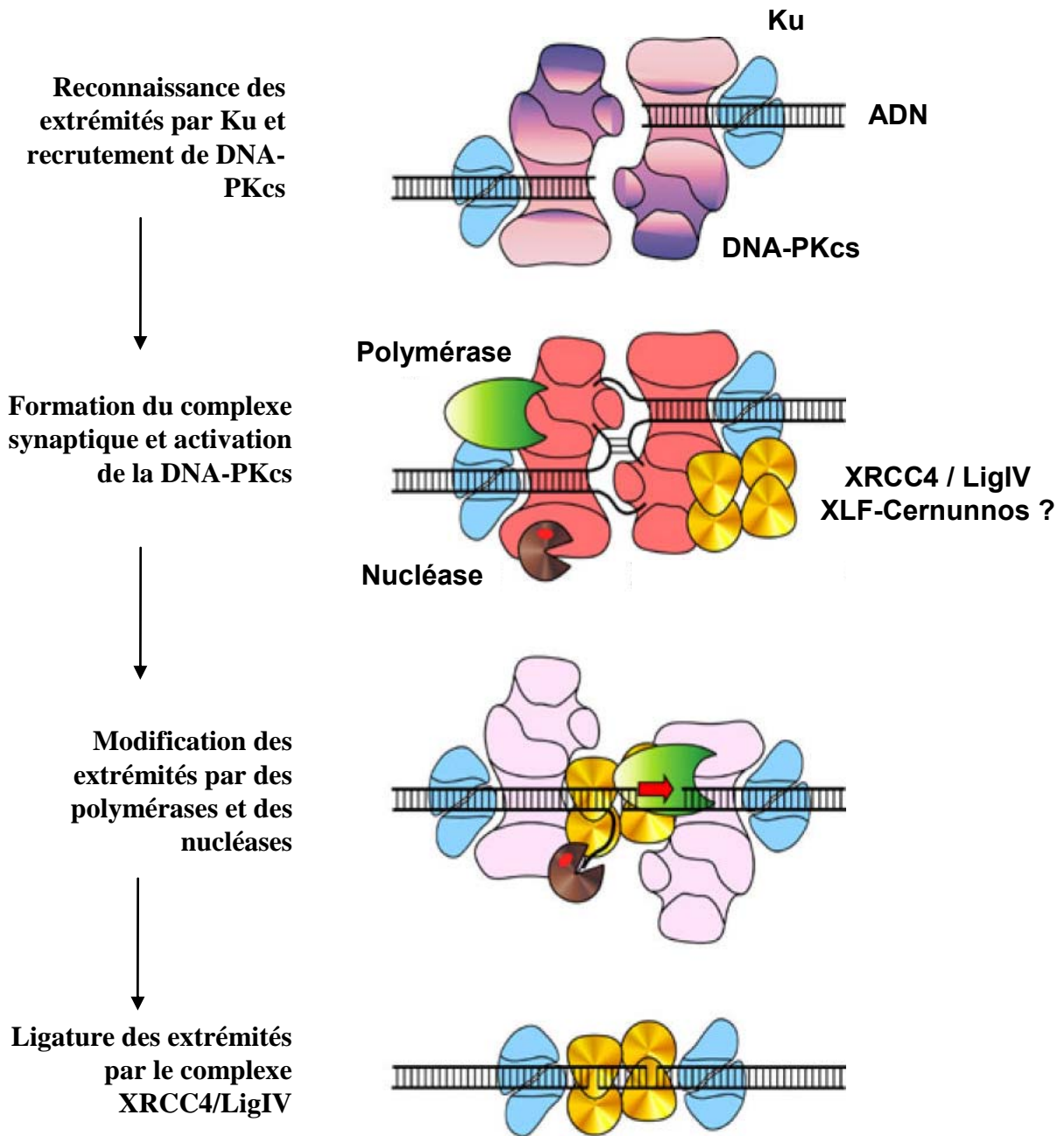


Figure 4: Modèle du NHEJ dépendant des complexes DNA-PK et XRCC4/LigIV. La reconnaissance des extrémités d'ADN est assurée par l'hétérodimère Ku qui recrute la kinase DNA-PKcs. La formation d'un complexe synaptique entre les deux extrémités active l'activité kinase de la DNA-PKcs. Les extrémités sont modifiées par des nucléases et des polymérase afin de pouvoir être liées par le complexe XRCC4/LigIV assisté de la protéine XLF-Cernunnos (d'après Budman and Chu, 2005).

Introduction

Reconnaissance des DSB

De part son affinité très forte pour les extrémités d'ADN double-brin, l'hétérodimère Ku est considéré comme étant le premier facteur du NHEJ à s'associer aux sites de DSB. Cette association permet le recrutement et l'activation de la kinase DNA-PKcs probablement par un changement de conformation (Boskovic et al., 2003). Ku se déplace alors à l'intérieur de la double-hélice par un mécanisme dépendant de l'activité kinase de DNA-PKcs (Calsou et al., 1999). Ce glissement de Ku serait important pour la réparation car le blocage du dimère aux extrémités d'un fragment d'ADN linéaire par des adduits de cis-platine inhibe l'activité de la LigIV *in vitro* (Kysela et al., 2003). Le rôle exact du complexe DNA-PK dans le NHEJ n'est pas encore totalement défini. Plusieurs rôles, non mutuellement exclusifs, sont possibles (pour revue voir Meek et al., 2004).

Rôle structurel du complexe DNA-PK

Le complexe DNA-PK est un bon candidat comme facteur d'alignement des extrémités de l'ADN. La microscopie électronique a montré en effet que la DNA-PKcs purifiée permet la formation d'une synapse (Figure 5) entre deux extrémités d'ADN double-brin (DeFazio et al., 2002). La formation de cette synapse serait d'ailleurs nécessaire à l'activation de DNA-PKcs (DeFazio et al., 2002; Weterings et al., 2003). Le complexe DNA-PK, et en particulier Ku, est également impliqué dans la protection des extrémités d'ADN (Chen et al., 2001b; Feldmann et al., 2000).

La DNA-PK interagit avec le complexe XRCC4/LigIV, avec des interactions spécifiques entre LigIV et Ku d'un côté et entre XRCC4 et DNA-PKcs de l'autre (Hsu et al., 2002). Ces interactions pourraient permettre une orientation correcte du complexe XRCC4/LigIV sur l'ADN à réparer. De plus, l'interaction du complexe XRCC4/LigIV avec Ku stimule son activité ligase *in vitro* (Nick McElhinny et al., 2000). Les interactions mises en évidence entre

Introduction

le complexe DNA-PK et des protéines comme WRN et pol μ suggèrent que la DNA-PK joue un rôle de plateforme de recrutement aux sites de DSB. En particulier, la DNA-PKcs est nécessaire au recrutement du complexe XRCC4/LigIV aux sites de dommages après induction massive de DSB (Drouet et al., 2005).

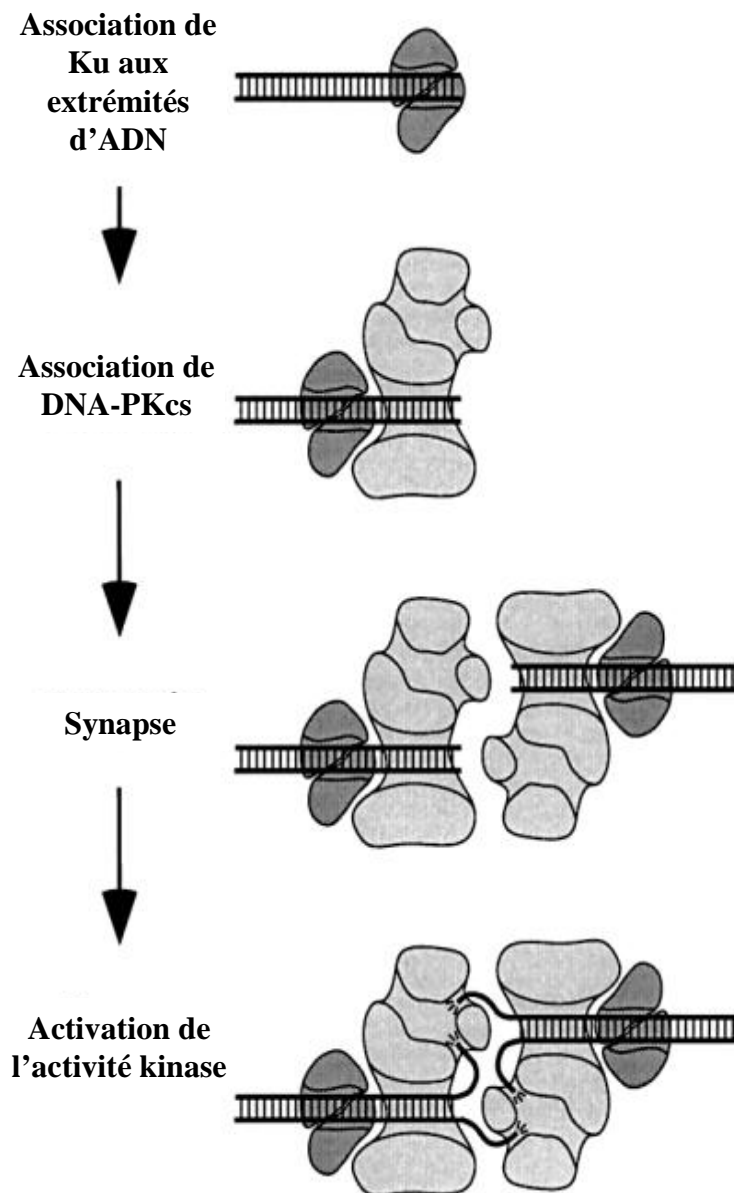


Figure 5: Modèle de la synapse formée par le complexe DNA-PK entre deux cassures. Ku présente une forte affinité pour les extrémités d'ADN double-brin. L'association de Ku aux extrémités entraîne le recrutement de la DNA-PKcs et le glissement de Ku vers l'intérieur de l'ADN. La formation d'une synapse entre deux complexes ADN/Ku/DNA-PKcs entraîne l'activation de l'activité kinase de DNA-PKcs (d'après DeFazio et al., 2002).

Introduction

Rôle activateur du complexe DNA-PK

L'expression d'une protéine DNA-PKcs portant un domaine kinase inactif ne restaure pas l'activité NHEJ dans des cellules déficientes en DNA-PKcs, suggérant que la présence de DNA-PKcs et son activité kinase sont nécessaires à la réparation (Kurimasa et al., 1999). Cependant, si les cibles de DNA-PKcs sont nombreuses *in vitro* (XRCC4, LigIV, Ku, Artemis, DNA-PKcs, p53...), la relevance biologique des ces phosphorylations *in vivo* reste à déterminer.

Ainsi, Ku est un substrat de DNA-PK_{CS} *in vitro* (Chan et al., 1999). Cependant, la DNA-PKcs n'est pas requise pour la phosphorylation de Ku *in vivo* et la complémentation de cellules déficientes en Ku par des mutants non phosphorylables permet quand même la restauration d'une sensibilité normale aux RI (Douglas et al., 2005). Il en est de même de mutants non phosphorylables de XRCC4 (Yu et al., 2003). XRCC4 est phosphorylée *in vitro* par DNA-PKcs dans la région C-terminale, une région qui n'est pas absolument requise pour la réparation des DSB (Leber et al., 1998). La phosphorylation de la LigIV n'est pas requise pour son activité ligase mais participerait à la régulation de sa stabilité (Wang et al., 2004b).

La DNA-PKcs est également capable de s'autophosphoryler. A l'heure actuelle, deux clusters de phosphorylation ont été mis en évidence par spectrométrie de masse : (i) le cluster ABCDE situé entre les résidus 2609 et 2647 (Douglas et al., 2002) et (ii) le cluster PQR situé entre les acides aminés 2023 et 2056 (Cui et al., 2005). La sérine 3205 est également phosphorylée *in vitro* (Douglas et al., 2002).

Les substitutions par l'alanine des sites ABCDE et/ou PQR (substitutions supprimant la phosphorylation) n'ont pas d'effets sur l'activité kinase de DNA-PKcs. Cependant, ces sites ont une importance fonctionnelle pour le NHEJ. De plus, ils fonctionneraient en réciprocity pour réguler l'accès aux extrémités d'ADN (Block et al., 2004; Cui et al., 2005; Ding et al., 2003). Cette réciprocity pourrait également permettre de réguler la balance entre NHEJ et RH

Introduction

(Cui et al., 2005). La DNA-PK_{CS} est autophosphorylée *in vivo* sur la thréonine 2609 (thr2609, cluster ABCDE) et la serine 2056 (ser2056, cluster PQR) de façon précoce (10 min) en réponse aux RI. La protéine phosphorylée est localisée aux sites de dommages dans des fibroblastes humains. La substitution de thr2609 ou ser2056 par l'alanine conduit à une radiosensibilité et un défaut de réparation des DSB dans des cellules de hamster (Chan et al., 2002; Chen et al., 2005). Quand l'activité kinase de la DNA-PK_{CS} est inhibée *in vitro*, le complexe DNA-PK reste associé aux extrémités d'ADN et les protège de toute modification par une nucléase ou une polymérase (Calsou et al., 1999; Merkle et al., 2002; Weterings et al., 2003). La phosphorylation de DNA-PK_{CS} en réponse aux RI pourrait être régulée par la protéine MDC1 (Lou et al., 2004) et par une interaction physique avec la phosphatase PP5 (Wechsler et al., 2004). L'hypo-phosphorylation (sur-expression de PP5) ou l'hyper-phosphorylation (dominant négatif de PP5) de la DNA-PK_{CS} entraîne une augmentation de la radiosensibilité, ce qui indique que l'état de phosphorylation de DNA-PK_{CS} doit être strictement régulé au cours de la réparation.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que la protéine DNA-PK_{CS} subit une série de phosphorylations induisant des modifications de conformation. Ces changements permettent de réguler l'accès aux extrémités de l'ADN et la progression dans le processus de réparation (Figure 6) (Meek et al., 2004).

Modification des extrémités

Les protéines impliquées dans la modification des extrémités d'ADN restent encore à caractériser. L'analyse de jonctions obtenues *in vivo* et *in vitro* montre bien que ces modifications existent. Ainsi, Budman et Chu ont montré que, dans un système *in vitro* dépendant des protéines majeures du NHEJ, les extrémités cohésives ou franches ne sont pas modifiées alors que les extrémités non homologues subissent les modifications théoriquement envisagées (Figure 7) : (i) remplissage ou résection des extrémités saillantes pour les rendre

Introduction

franches, (ii) remplissage par polymérisation à travers une discontinuité et (iii) alignement des extrémités sur des séquences de micro-homologies internes (Budman and Chu, 2005).

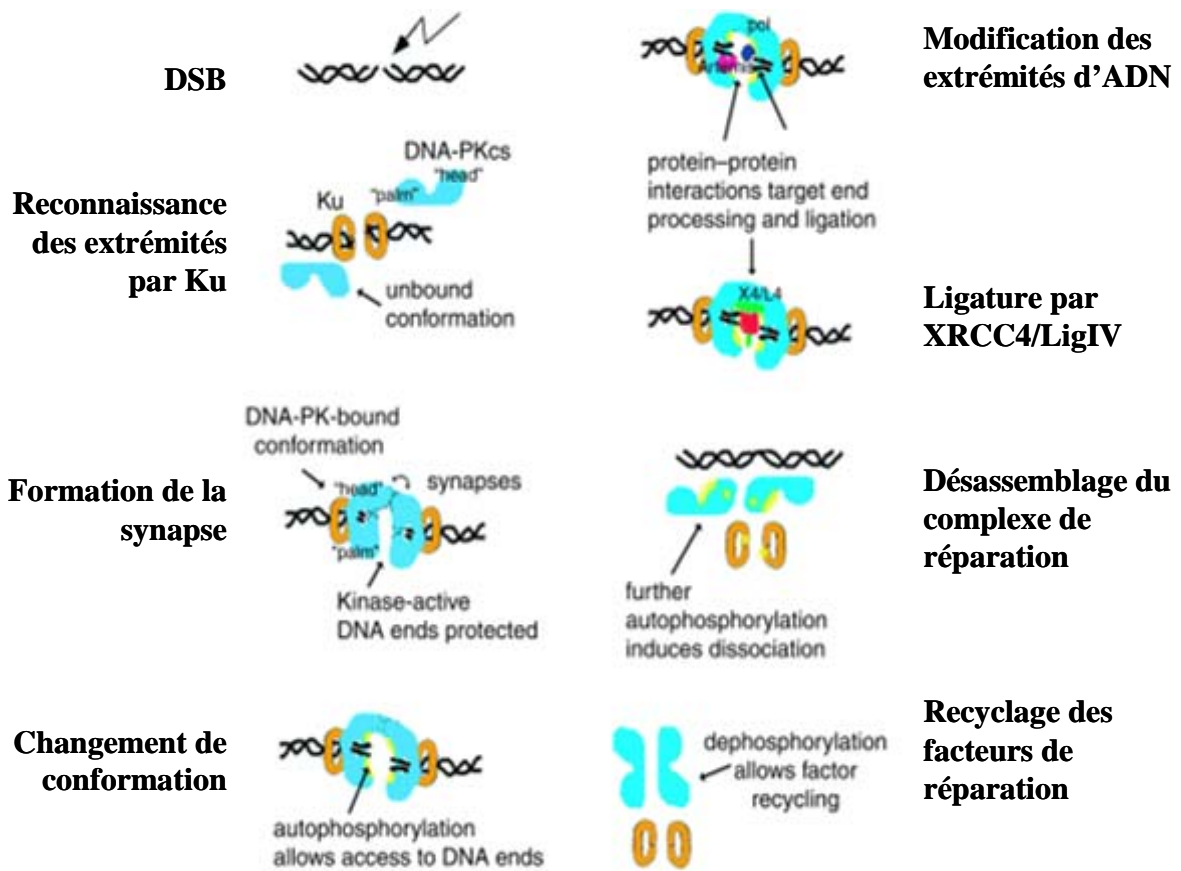


Figure 6: Autophosphorylation et déphosphorylation du complexe DNA-PK au cours du NHEJ. La phosphorylation de la DNA-PKcs à différents sites entraîne des modifications de conformation de la kinase qui régulent l'accès aux extrémités d'ADN et la progression dans le processus de réparation (d'après Meek et al., 2004).

Introduction

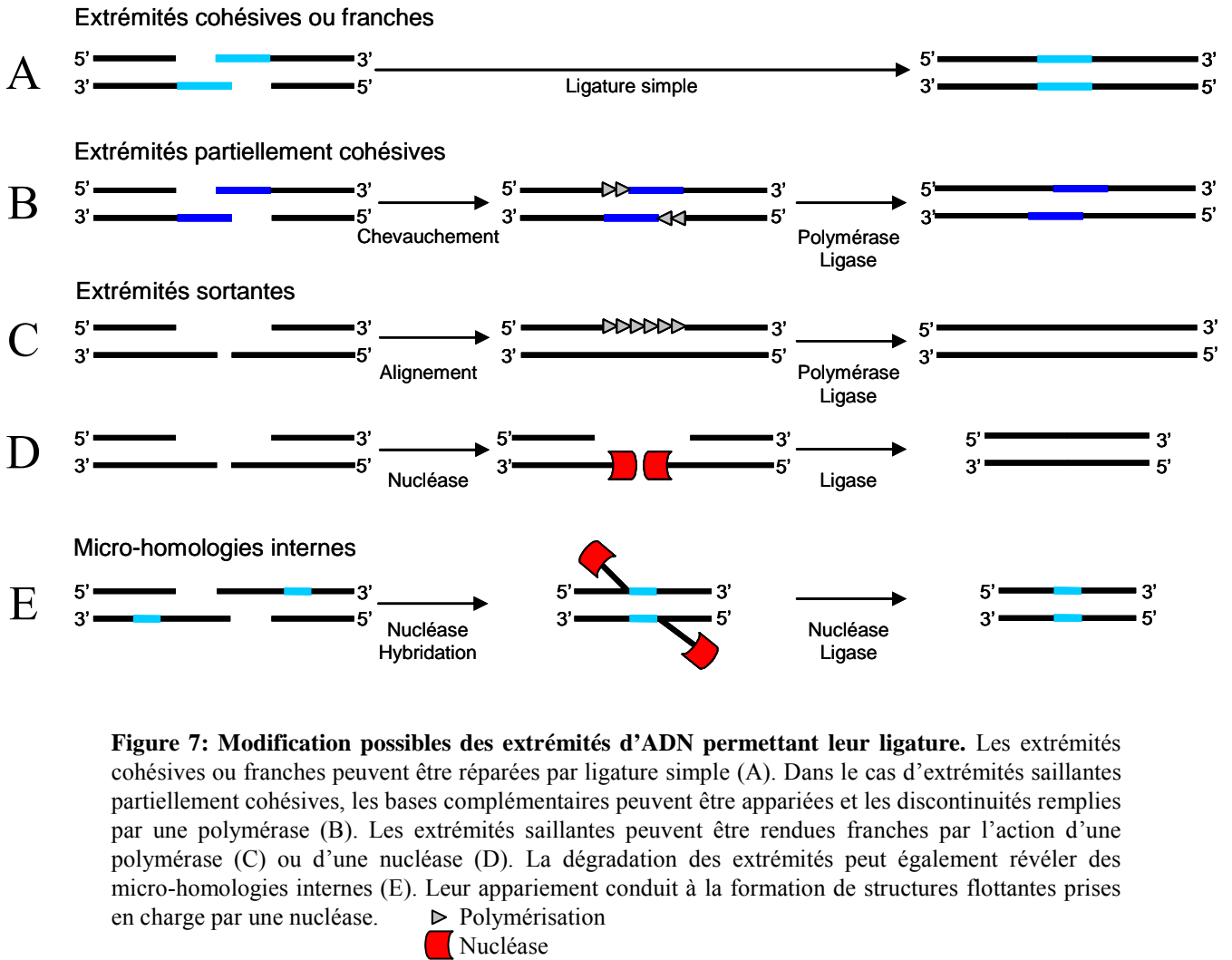


Figure 7: Modification possibles des extrémités d'ADN permettant leur ligature. Les extrémités cohésives ou franches peuvent être réparées par ligature simple (A). Dans le cas d'extrémités saillantes partiellement cohésives, les bases complémentaires peuvent être appariées et les discontinuités remplies par une polymérase (B). Les extrémités saillantes peuvent être rendues franches par l'action d'une polymérase (C) ou d'une nucléase (D). La dégradation des extrémités peut également révéler des micro-homologies internes (E). Leur appariement conduit à la formation de structures flottantes prises en charge par une nucléase.

Introduction

La modification et la ligature des extrémités nécessitent leur maintien à proximité. Le complexe DNA-PK peut remplir ce rôle de facteur d'alignement. Des résultats suggèrent que le complexe XRCC4/LigIV pourrait également intervenir dans cette étape. Dans des cellules de hamster déficientes en XRCC4 (CHO XR-1), la réparation *in vitro* d'un substrat généré par des radicaux libres et présentant des extrémités 3'-PG est compromise non seulement au niveau de l'étape de ligature, mais également au niveau de l'étape de remplissage des discontinuités (Lee et al., 2003). De plus, dans des cellules de patients présentant une mutation hypomorphique du gène *LIG4*, les jonctions obtenues *in vivo* présentent un excès de dégradation des extrémités (Smith et al., 2003). Enfin, la PNK interagit avec XRCC4 et l'invalidation de cette interaction est associée à une augmentation de la radiosensibilité et à une diminution de l'activité de ligature du complexe XRCC4/LigIV *in vitro* (Koch et al., 2004). Ces résultats montrent que le complexe XRCC4/LigIV joue un rôle antérieur à l'étape de ligature proprement dite.

Ligature des extrémités

L'étape finale de la réparation d'une DSB selon ce modèle est la ligature des extrémités. Elle est assurée par le complexe XRCC4/LigIV. Le rôle de la protéine XLF-Cernunnos, qui interagit avec ce complexe, reste à déterminer.

B) Voies alternatives du NHEJ

La gradation de sévérité des phénotypes de souris KO pour un gène du NHEJ (mort embryonnaire pour les souris XRCC4^{-/-} et LigIV^{-/-} et survie pour les souris Ku^{-/-} et DNA-PKcs^{-/-}) a conduit certains auteurs à postuler l'existence de voies alternatives du NHEJ. De nombreux résultats obtenus *in vivo* et dans des systèmes *in vitro* utilisant des extraits cellulaires ou des protéines purifiées suggèrent l'existence de ces voies qui présentent des

Introduction

facteurs protéiques, une cinétique, une efficacité ou une précision différents de ceux de la voie décrite ci-dessus.

Dépendance à la DNA-PK

L'absence d'homologue de DNA-PKcs chez la levure (Daley et al., 2005) a conduit à s'interroger sur la stricte nécessité de cette kinase pour le NHEJ chez les eucaryotes supérieurs.

Les résultats parfois contradictoires obtenus *in vitro* peuvent s'expliquer par des différences dans les protocoles utilisés. La plupart des tests de NHEJ *in vitro* sont sensibles à la wortmanine, un inhibiteur des kinases de la famille PIKK et donc de la DNA-PKcs (Baumann and West, 1998; Pospiech et al., 2001). Cependant, dans certains cas, les extraits de cellules M059J (lignée humaine totalement déficiente en protéine DNA-PKcs) conservent une activité NHEJ (Wang et al., 2003) alors que d'autres systèmes démontrent l'absence de réparation *in vitro* (Hanakahi et al., 2000; Merel et al., 2002). Dans des extraits de cellules HeLa, la ligature d'extrémités cohésives nécessite l'activité du complexe DNA-PK, mais cette dépendance se perd avec la purification de l'activité NHEJ (Huang and Dynan, 2002). Ces expériences de fractionnement ont mis en évidence l'existence d'une voie dépendant du complexe MRN, ne nécessitant pas la présence de DNA-PKcs mais requérant le complexe XRCC4/LigIV (Udayakumar et al., 2003). Cette voie serait déficiente dans des fibroblastes de patients atteints de l'anémie de Fanconi (Donahue and Campbell, 2004). Cependant, la stratégie d'inhibition par électroporation d'anticorps utilisé dans cette étude est contestable. Les cellules de hamster déficientes en Ku (CHO-xrs6) conservent une activité de réparation NHEJ encline à l'erreur et basée sur l'utilisation de micro-homologies (Feldmann et al., 2000; Guirouilh-Barbat et al., 2004; Secretan et al., 2004). Ce résultat est partiellement corroboré par l'analyse d'extraits de cellules humaines. Alors que l'addition d'anticorps dirigés contre Ku inhibe le NHEJ, sa déplétion n'a pas d'effet (Wang et al., 2003). Les anticorps

Introduction

bloqueraient Ku aux extrémités de l'ADN, empêchant des voies alternatives d'assurer la ligature.

In vivo, l'analyse par électrophorèse en champs pulsés (PFGE pour l'anglais *pulse-field gel electroforesis*) a montré l'existence de deux composantes de réparation des DSB : (i) une composante rapide (30 min) majoritaire en présence de DNA-PKcs et (ii) une composante lente (12 h) qui permet de prendre en charge une proportion similaire de DSB en l'absence de DNA-PKcs (DiBiase et al., 2000). Wang et collaborateurs ont proposé de nommer ces deux composantes D-NHEJ (de l'anglais *DNA-PK-dependent NHEJ*) et B-NHEJ (de l'anglais *backup NHEJ*) (Wang et al., 2003). L'analyse de la réparation de substrats linéarisés transfectés dans des cellules en culture montre que l'addition de wortmannine n'a d'influence que sur les extrémités non-homologues, indiquant que la DNA-PK_{CS} serait donc dispensable à la ligature d'extrémités cohésives (Smith et al., 2001). Cependant, la réparation de cassures franches obtenues *in cellulo* dans le génome de cellules de hamster (Kuhne et al., 2003) ou par un système de transposon (van Heemst et al., 2004) nécessite la DNA-PKcs, l'hétérodimère Ku et la protéine XRCC4.

Voies basées sur les micro-homologies

Outre le NHEJ et la RH, les cellules disposent d'une troisième voie de réparation moins bien caractérisée : le SSA. Le SSA est un mécanisme de réparation non conservatif qui prend place au niveau de répétitions directes (pour revue voir Valerie and Povirk, 2003). Il se caractérise par la génération d'extrémités simple-brin d'ADN permettant l'hybridation de séquences homologues. La réparation est complétée par le clivage des extrémités simple-brin non appariées et la ligature. Il conduit à la perte des séquences situées entre les homologies appariées et les extrémités d'ADN. Le SSA peut impliquer la formation d'extrémités simple-brin et l'appariement de séquences complémentaires allant de quelques bases (on parle alors de micro-homologies) à plusieurs centaines de bases (SSA classique). Suivant la

Introduction

longueur, différentes protéines interviennent et le SSA s'apparente au NHEJ ou à la RH. Lors du SSA classique, c'est vraisemblablement le complexe MRN qui est responsable de l'exposition des extrémités simple-brin. Cette voie nécessite la protéine Rad52. La protéine RPA protégerait les extrémités simple-brin exposées. Après l'hybridation, le clivage des extrémités flottantes est assuré par la nucléase XPF/ERCC1. Le SSA se servant de micro-homologies est encore moins bien connu. Des protéines comme Mre11, la ligase I (LigI), la ligase III (LigIII) et l'hélicase WRN ont été impliquées. Au vu des résultats contradictoires obtenus, il est vraisemblable qu'il existe au moins deux voies de SSA basées sur les micro-homologies, une dépendant du complexe Ku et l'autre indépendante.

Une activité de réparation des DSB indépendante de DNA-PK, encline à l'erreur et basée sur la présence de micro-homologies a été purifiée dans des extraits d'œufs de Xénope. Cette fraction contient les protéines FEN-1, pol ϵ et LigIII (Gottlich et al., 1998). Certains auteurs nomment cette voie (ou ces voies) MHEJ ou MMEJ (de l'anglais *microhomology-mediated end joining*) (Liang et al., 2005; Zhuang et al., 2006). Dans des extraits nucléaires, le MHEJ prédomine pour les ratios ADN/protéines élevés. Il est inhibé par l'hétérodimère Ku et l'histone H1 et nécessite la protéine FEN-1 (Liang et al., 2005). La protéine BRCA1 a également été impliquée dans la réparation par utilisation des micro-homologies puisque des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) BRCA1^{-/-}/p53^{-/-} présentent une diminution de 50 à 100 fois de la réparation par micro-homologies d'un substrat intégré (Zhong et al., 2002b). Cependant, les résultats concernant BRCA1 sont contradictoires (pour revue voir Bau et al., 2005). En 2006, deux études indépendantes ont montré que la protéine BRCA1 participe à la régulation de la fidélité du NHEJ sous le contrôle de la kinase Chk2 (Wang et al., 2006; Zhuang et al., 2006). Plus précisément, la protéine BRCA1 facilite la voie précise du NHEJ tout en inhibant le MMEJ et en minimisant la taille des délétions (Zhuang et al., 2006). Ce

Introduction

rôle pourrait être expliqué par la protection des extrémités d'ADN contre l'action de la nucléase Mre11.

Candidats pour le NHEJ alternatif

Qu'elles soient nommées B-NHEJ ou MHEJ, les voies alternatives de NHEJ sont loin d'être caractérisées tant au niveau moléculaire que dans leur contribution dans la vie cellulaire *in vivo*.

Wang et collaborateurs soulignent la prédominance de la LigIV *in vivo* mais suggèrent que la LigIII pourrait assurer la ligature de DSB quand le D-NHEJ est déficient (Wang et al., 2005a). Ces résultats sont confirmés par la mise au point d'un test *in vitro* défavorisant la voie dépendant de DNA-PK et mettant en évidence une activité de jonction des extrémités dépendant de PARP1 (poly(ADP-ribose) polymérase 1) et du complexe LigIII/XRCC1 (Audebert et al., 2004). Les protéines PARP1, LigIII et XRCC1 jouent un rôle central dans le BER (Hoeijmakers, 2001). L'inhibition de PARP1 sensibilise les cellules aux DSB créés par la CAL (Audebert et al., 2004). Cependant, l'implication de PARP1 dans la réparation des DSB reste à confirmer. En particulier, l'inactivation de PARP1 dans des cellules de souris n'a pas de conséquence sur la réparation par RH ou NHEJ de substrats intégrés dans le génome (Yang et al., 2004). Mais ce résultat ne suffit pas à rejeter le rôle de PARP1 dans la réparation des DSB, des mécanismes de compensation pouvant exister.

Riballo et collaborateurs font l'hypothèse qu'environ 90% des DSB induites par les RI en phase G1 sont réparées par le NHEJ classique. Les 10% restantes, réparées avec une cinétique lente, seraient prises en charge par une voie dépendant d'ATM, Artemis, H2AX, 53BP1, MRN, DNA-PKcs et LigIV (Kuhne et al., 2004; Riballo et al., 2004).

Introduction

Vers un modèle itératif de NHEJ

Lieber et al. mettent en cause l'existence ou, tout du moins, la signification des voies de NHEJ alternatives *in vivo* (Lieber et al., 2004). Ils se basent sur deux constatations: (i) la réparation de cassures simples générées directement dans la cellule nécessite les protéines Ku, DNA-PKcs, XRCC4 et LigIV (van Heemst et al., 2004) ; (ii) les cellules déficientes en une de ces protéines sont radiosensibles, ce qui indique que les voies alternatives ne peuvent pas compenser la perte de la voie classique *in vivo*.

La réparation NHEJ a été reconstituée *in vitro* en utilisant les protéines purifiées Ku, DNA-PKcs, Artemis, XRCC4 et LigIV (Ma et al., 2004). Ces travaux ont, entre autre, mis en évidence la capacité du complexe XRCC4/LigIV à liguer un brin d'ADN alors que l'autre est dans un état non liable, à la condition que les deux brins soient appariés par au moins deux paires de bases. Cette flexibilité, ajoutée à la grande variété de substrats pris en charge par la nucléase Artemis/DNA-PKcs et à l'implication de polymérase trans-lésionnelles dans l'activité de synthèse du NHEJ, les a conduit à proposer un modèle itératif du NHEJ (Ma et al., 2005). Dans ce modèle, les deux brins d'ADN peuvent être traités séparément et par des mécanismes impliquant des protéines différentes (Figure 8). Ce modèle itératif constitue une piste de réflexion intéressante prenant en compte la diversité des DSB et permettant d'unifier les différentes voies assimilées au NHEJ. En outre, il ouvre la possibilité d'une coopération de différents mécanismes pour la réparation d'une même cassure. Une telle coopération a été démontrée entre la RH et le NHEJ aux sites de DSB induits par l'irradiation aux UVA (Rapp and Greulich, 2004). De façon plus surprenante, dans des cellules de rongeur, la déficience dans les protéines de réparation des mésappariements Mlh1 ou Msh2 a des conséquences sur la réparation par micro-homologies des DSB (Bannister et al., 2004; Smith et al., 2005).

Introduction

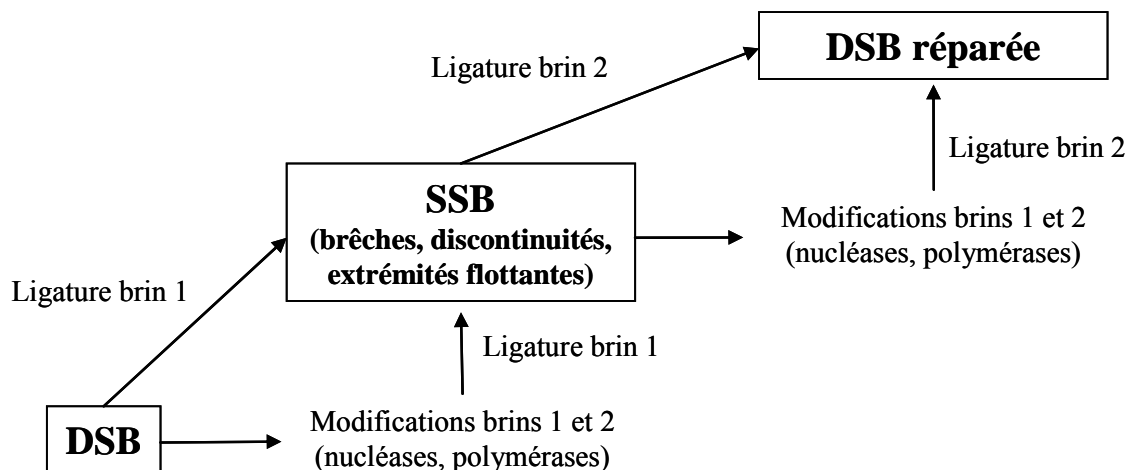


Figure 8: Modèle itératif de réparation d'une DSB par NHEJ. La ligation indépendante des deux brins augmente le nombre de voies possibles pour la réparation d'une DSB (D'après Ma et al., 2005).

II.4. Pathologies humaines associées à un défaut du NHEJ

A) SCID et RS-SCID

Les souris déficientes en protéine DNA-PKcs présentent une immunodéficience sévère (souris SCID de l'anglais *severe combined immunodeficiency*). Chez l'homme, le phénotype SCID résulte d'une mutation dans le gène codant la protéine Artemis et est associé à une radiosensibilité importante (syndrome RS-SCID) (Moshous et al., 2001). La plupart des patients présentent un niveau indétectable de protéine Artemis résultant de larges délétions du gène et conduisant à une absence complète de lymphocytes B et T périphériques. Cependant, on trouve également des mutations hypomorphiques laissant le domaine métallo- β -lactamase intact. Ces patients présentent une immunodéficience B et T partielle et une activité de recombinaison V(D)J résiduelle *in vitro*. De plus, ils sont particulièrement sensibles à l'infection par le virus EBV (O'Driscoll et al., 2004).

Introduction

B) Mutations hypomorphiques de LigIV

Le syndrome LIG4 est une maladie rare provenant d'une mutation dans le gène *LIG4*. Les cinq patients répertoriés à ce jour présentent des degrés plus ou moins sévères de pancytopenie, microcéphalie, retard de croissance et de développement et un faciès d'oiseau (O'Driscoll et al., 2004). Le patient 180BR, malgré un aspect clinique normal, présente une radiosensibilité marquée, mise en évidence par le traitement par radiothérapie d'une leucémie apparue dans son adolescence.

Les mutations du gène codant la LigIV retrouvées chez ces patients sont hypomorphiques. L'inactivation du gène chez la souris conduisant à une mortalité embryonnaire tardive, il est probable que des mutations plus sévères chez l'homme soient incompatibles avec la vie. La sévérité de l'atteinte clinique reflèterait l'impact de la mutation sur les fonctions de la LigIV.

Les cellules de patients LIG4 présentent un défaut de NHEJ *in vitro* mais des points de contrôle du cycle cellulaire normaux en réponse à l'irradiation. La prédisposition au cancer d'un des patients (leucémie) est insuffisante pour prouver une relation causale entre cancer et défaut de LigIV.

C) Mutations de XLF-CERNUNNOS

L'étude de cinq patients présentant des caractéristiques cliniques proches de celles retrouvées dans les syndromes LIG4 et NBS (syndrome causé par une mutation du gène *NBS1*) mais n'ayant pas de défauts des points de contrôle du cycle cellulaire ou de mutations dans une protéine connue du NHEJ a mis en évidence l'existence du facteur XLF-Cernunnos (Buck et al., 2006). Les patients présentent un retard de croissance, une microcéphalie et une lymphocytopénie B et T de moyenne à sévère. La majorité présente des malformations variées. Tous sont soumis à des infections bactériennes, virales ou parasitaires récurrentes.

Les fibroblastes issus de ces patients présentent une radiosensibilité équivalente voire plus prononcée que celle des cellules déficientes en ATM, NBS1, LigIV ou Artemis.

Introduction

L'immunodéficience est associée à un défaut de la recombinaison V(D)J *in vitro* toutefois moins sévère que dans le syndrome RS-SCID. L'analyse de la réparation de DSB créés par coupure enzymatique révèle un défaut du NHEJ (Buck et al., 2006).

Les cellules isolées à partir de ces patients contribuent à la connaissance du NHEJ et de la recombinaison V(D)J. Ces différents syndromes soulignent l'importance des protéines du NHEJ dans la maturation du système immunitaire et dans le développement. Cependant, il reste à établir si de tels déficits entraînent une prédisposition au développement de cancers. A ce jour, aucune pathologie humaine associées des mutations des gènes *KU70*, *KU80*, *DNA-PKcs* ou *XRCC4* n'est répertoriée.

III. La protéine kin17

Chez la bactérie, la protéine RecA est impliquée dans la réparation par recombinaison et la réponse SOS (Anderson and Kowalczykowski, 1998; Kowalczykowski et al., 1994). Le système SOS est un mécanisme de survie mis en place par la bactérie en réponse à la présence massive de lésions de l'ADN provoquée par des agents génotoxiques. La protéine RecA initie le processus en reconnaissant les dommages de l'ADN et en activant la vingtaine de gènes impliqués à travers le clivage du répresseur LexA (pour revue voir Schlacher et al., 2006). Le rôle essentiel de la protéine RecA chez *E. coli* dans la recombinaison, la mutagenèse et la régulation des gènes SOS a conduit à rechercher des protéines analogues chez les eucaryotes. La protéine kin17 a été découverte en 1989 dans des cellules de rat grâce à un anticorps polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine RecA (Angulo et al., 1989).

III.1. Conservation des protéines kin17 au cours de l'évolution

Les gènes *KIN17* murin et humain ont été clonés et séquencés au laboratoire (brevet CEA 1993 et 1998). Ils se situent respectivement sur le chromosome 2 murin et sur le bras court de chromosome 10 en position télomérique chez l'homme (Figure 9) (Angulo et al., 1991). Le gène *KIN17* humain a une longueur de 20 kb et présente 12 exons et 11 introns. Les protéines kin17 murine ($_{MMU}kin17$) et humaine ($_{HSA}kin17$) sont identiques à 92,4% (Kannouche et al., 2000). Elles comptent respectivement 391 et 393 acides aminés pour une masse moléculaire de 45 et 47 kDa. Leur point isoélectrique est de 9,3. La séquence d'acides aminés de la protéine $_{HSA}kin17$ est présentée Figure 10.

Introduction

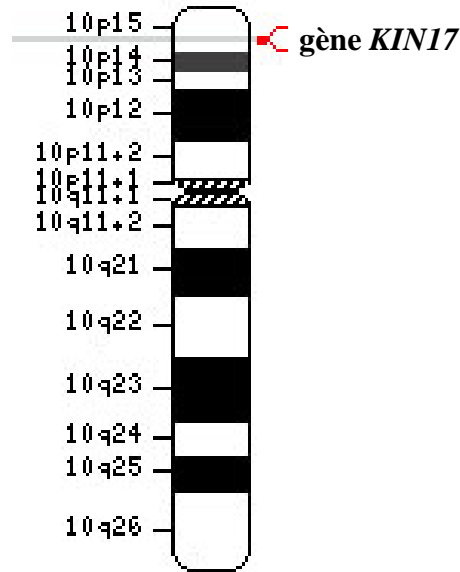


Figure 9: Localisation du gène *KIN17* chez l'homme. Le gène *KIN17* humain est situé sur le bras court du chromosome 10 en position télomérique.

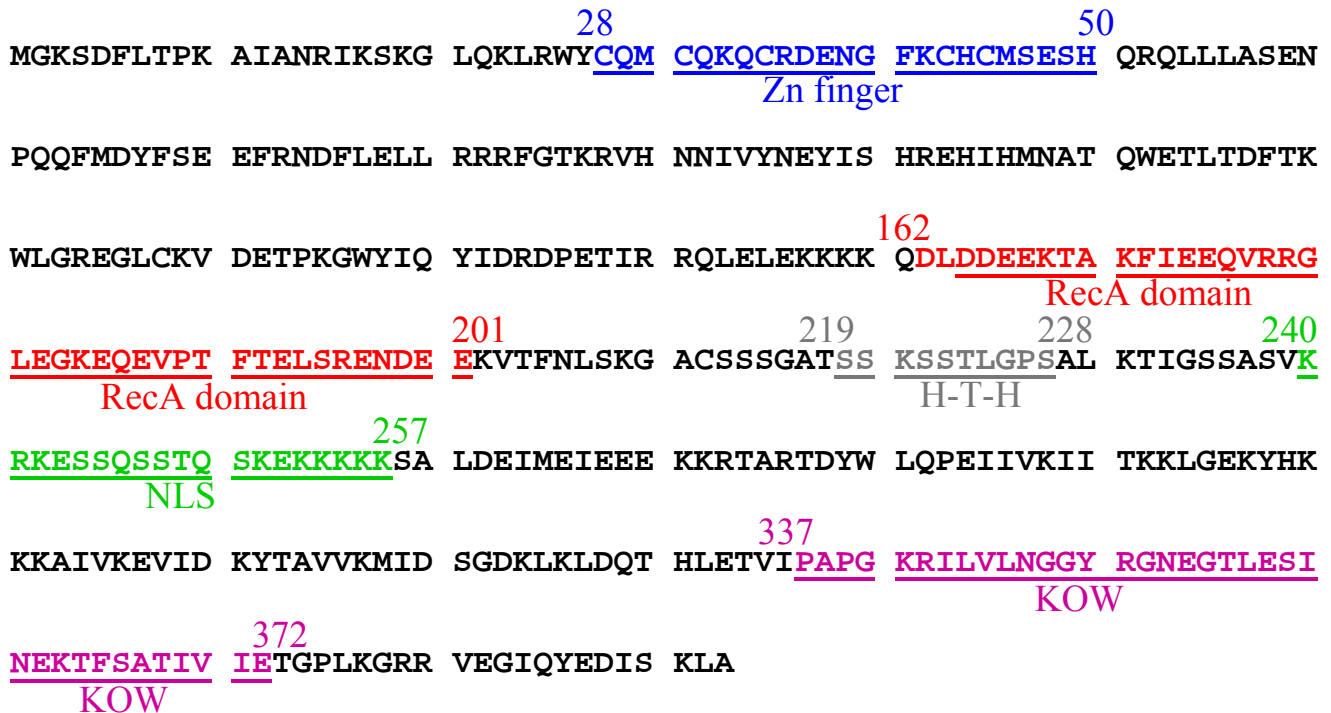


Figure 10: Séquence de la protéine ^{HSA}kin17. Zn finger: doigt de zinc; RecA domain: domaine d'homologie à la protéine RecA d'*E. coli*; H-T-H: domaine helix-turn-helix; NLS: signal de localisation nucléaire; KOW: motif Kyprides, Ouzounis, Woese. La position des acides aminés est indiquée au dessus de la séquence.

Introduction

	1 10 20 30 40 50 60
<i>H. sapiens</i> (O60870)	MGKSDFLTPKAIANRIKSKGLQKLRWYQCQMCQKQCRDENGFKCHCMSESHQRQLLLASEN
<i>M. Musculus</i> (Q8K339)	MGKSDFLSPKAIANRIKSKGLQKLRWYQCQMCQKQCRDENGFKCHCMSESHQRQLLLASEN
<i>A. gambiae</i> (EAA45011)	-GKAEVGTPKYLANKMKAKGLQKLRWYQCQMCQKQCRDENGFKCHTMSSESHQRQILLFADN
<i>D. melanogaster</i> (Q8SXR2)	MGRAEVGTPKYLANKMKSKGLQKLRWYQCQMCQKQCRDENGFKCHTMSSESHQRQLLLFADN
<i>A. thaliana</i> (Q9ZVU5)	MGKNDFLTPKAIANRIKAKGLQKLRWYQCQMCQKQCRDENGFKCHCMSESHQRQMQVFGQN
<i>C. elegans</i> (Q9XWF2)	MGKHEKGSKDLANRTKSKGLQKLRWYQCQMCQKQCRDENGFKCHTSEAHQRQLLLFAEN
<i>O. sativa</i> (Q9AY87)	MGKHEFLTPKAIANRIKAKGLQKLRWYQCQMCQKQCRDENGFKCHCMSESHQRQMQVFGQA
<i>P. falciparum</i> (Q8IKG2)	MPRAEPGTPKWLANKMKAKGLQKLRWYQCQMCQKQCRDENGFKCHRLSETHQRQMQIFCQD
<i>S. pombe</i> (Q9Y7X9)	MGRAEAGTPKAISNALKSKGLQRLRWYCSACQKQMRDENGFKCHTQSEGHIRQMNVIAMN
<i>N. crassa</i> (EAA31362)	MPKAEVGS AKYLANKMKSRGLNRLRWYQQLCEKSCRDENGKMHQCQSPSHTAKALEAGAN
<i>S. cerevisiae</i> (RTS2) (P40962)	--MADYDSAKYWSKQGARRGLQKTRYQCICQRCQCKDANGFQSHNKSPSHLRKISQVTAE
	: : . * : : : * * * : : : : * * * :
	70 80 90 100 110 120
<i>H. sapiens</i> (O60870)	PQQFMDYFSEEFNRNDFLELLRRRFGTKRVHMNIYVNEYISHREHIHMNATQWETLTDFTK
<i>M. Musculus</i> (Q8K339)	PQQFMDYFSEEFNRNDFLELLRRRFGTKRVHMNIYVNEYISHREHIHMNATQWETLTDFTK
<i>A. gambiae</i> (EAA45011)	AGRFIDGFSSEFLTGYLQILRRQFGTKRVAANKVYQEYIADRHHLHMNATKWHSLSDFVK
<i>D. melanogaster</i> (Q8SXR2)	PGKFLHSFSKEFSDGYMELLRRRFGTKRRTSANKIYQEYIAHKEHIHMNATRWTLSDYVK
<i>A. thaliana</i> (Q9ZVU5)	PTRVVDGYSEEFQTFDLMRRSHRFSRIAATVVYNEYINDRHVHMNSTEWATLTFEIK
<i>C. elegans</i> (Q9XWF2)	SNSYLRQFSNDFEKNFMQLLRYSYGTKRVRANEVYNAF IKDKGHVHMNSTVWHSLTGFVQ
<i>O. sativa</i> (Q9AY87)	PDRVVEGFSEEFDAFLTLRRAHRHSRIAATVVYNEFIADRHHVHMNSTRWATLTFVVK
<i>P. falciparum</i> (Q8IKG2)	ANKFMDYSA MFEKEF MRLMKTKYCRARILANTVYTNMISDKGHIHMNATVWVTLTDFVL
<i>S. pombe</i> (Q9Y7X9)	PGKRIQDFSNQFLRDFISLLRTAHGEKKIHFNQFYQEYIRDKNHVHMNATRWHLSEFC
<i>N. crassa</i> (EAA31362)	FKGVQDTFSDQFLKDFIAQLKTSHGEGE IHINKFYQEVIARKDHVHLNATKWHSLTEFAK
<i>S. cerevisiae</i> (RTS2) (P40962)	DAR--R-YNIQFEKGFLLQLKQRHGEKVIDANKVYNEYVQDRDHVHMNATMHRSLTQFVR
	: . * : : . . . : : * * * * * : * : :
	130 140 150 160 170
<i>H. sapiens</i> (O60870)	WLGREGLCCKVD----ETP---KGWYIQYIDRDPETIRRQLELEKK-KKQDLDDDEEKTAKF
<i>M. Musculus</i> (Q8K339)	WLGREGLCCKVD----ETP---KGWYIQYIDRDPETIRRQLELEKK-KKQDLDDDEEKTAKF
<i>A. gambiae</i> (EAA45011)	YLGRNGHCVAD----ETD---KGWFITYIDRDPETLAMQEKMAKK-QKMDKDDAERLAEF
<i>D. melanogaster</i> (Q8SXR2)	WLGRTGQVIAD----ETE---KGWFVITYIDRSPEAMERQAKADSK-EKMEKDDEERMADF
<i>A. thaliana</i> (Q9ZVU5)	HLGKTGKCKVE----ETP---KGWFITYIDRSETLTKERLKNKR-VKSDLAEEEKQERE
<i>C. elegans</i> (Q9XWF2)	YLGSSGKCKID----EGD---KGWYIAYIDQ--EALIRKEEDQRK-QQOEKDDDEERHMQI
<i>O. sativa</i> (Q9AY87)	FLGREGHCCKVE----DTP---KGWFITYIDRSEQAVKARLKRKR-IKSDLAEDERQERM
<i>P. falciparum</i> (Q8IKG2)	YLGKTGKCKIE----QTE---RGWYLEYIDR--EKIEREKAYQER-KKIEYSYEELKEKK
<i>S. pombe</i> (Q9Y7X9)	FLGRQGMCRVE----ENE---KGFVISYIDKNPANILRNEANKKR-ERQEKSDDEEQLRL
<i>N. crassa</i> (EAA31362)	FLGREGLCRVE----EKEG--EGLFVAWIDDSPEAMERREKTTTQDGVSSQAKVEASSKG
<i>S. cerevisiae</i> (RTS2) (P40962)	YLGRAGKVDVDMIDDTSENVEGPLLIRIHPSSLSSPSEDGMLRS---QOEEQEVIAAEL
	* * * : : . * : * . :
	180 190 200 210
<i>H. sapiens</i> (O60870)	IEEQVRRGLE-----GKEQE-VPTFTELSRENDDEEKVTFNLS---KGAC
<i>M. Musculus</i> (Q8K339)	IEEQVRRGLE-----GKEQE-TPVFTTELSRENEEEKVTFNLN---KGAG
<i>A. gambiae</i> (EAA45011)	IEEQVRRGKT-----EEEPCTSGYSELKRENEEDTIKIELK---LGSK
<i>D. melanogaster</i> (Q8SXR2)	IEQQIKNAKAK-----DGEEDGQEKFTTELKRE-ENEPLKLDIR---LEKK
<i>A. thaliana</i> (Q9ZVU5)	IQRQIERAAE---KLNG--G-----GGEGETSGNDEVVDDGDDERKKDEDLRL--LKSGV
<i>C. elegans</i> (Q9XWF2)	MDGMVQRGKE-----LAGDDEHEYEATELIRDTPDQKIQLDLN---LGIL
<i>O. sativa</i> (Q9AY87)	IARQIERAQQSMGKTNGELGDDASPDGSEGESGSEDEYSSENDHEGQEDAKEANKAAG
<i>P. falciparum</i> (Q8IKG2)	INEAIQEAKKKGTFTIES----EYTALEKKNDEKIIISSIKTMNDTNSIK-DLKP-NVNIIF
<i>S. pombe</i> (Q9Y7X9)	LDEQIKRAYES-----AQONNE--DNKDGSSRE-QPVLHEIDLS---KKN
<i>N. crassa</i> (EAA31362)	EEATAKTAE-----ESK--PAVDSTAGPAGPAAAAAPAT---KPV
<i>S. cerevisiae</i> (RTS2) (P40962)	LKRQLNRAKR-----QTEKVYQPEMKSEISGDSTLKRQVTFHNGRNVNK

Introduction

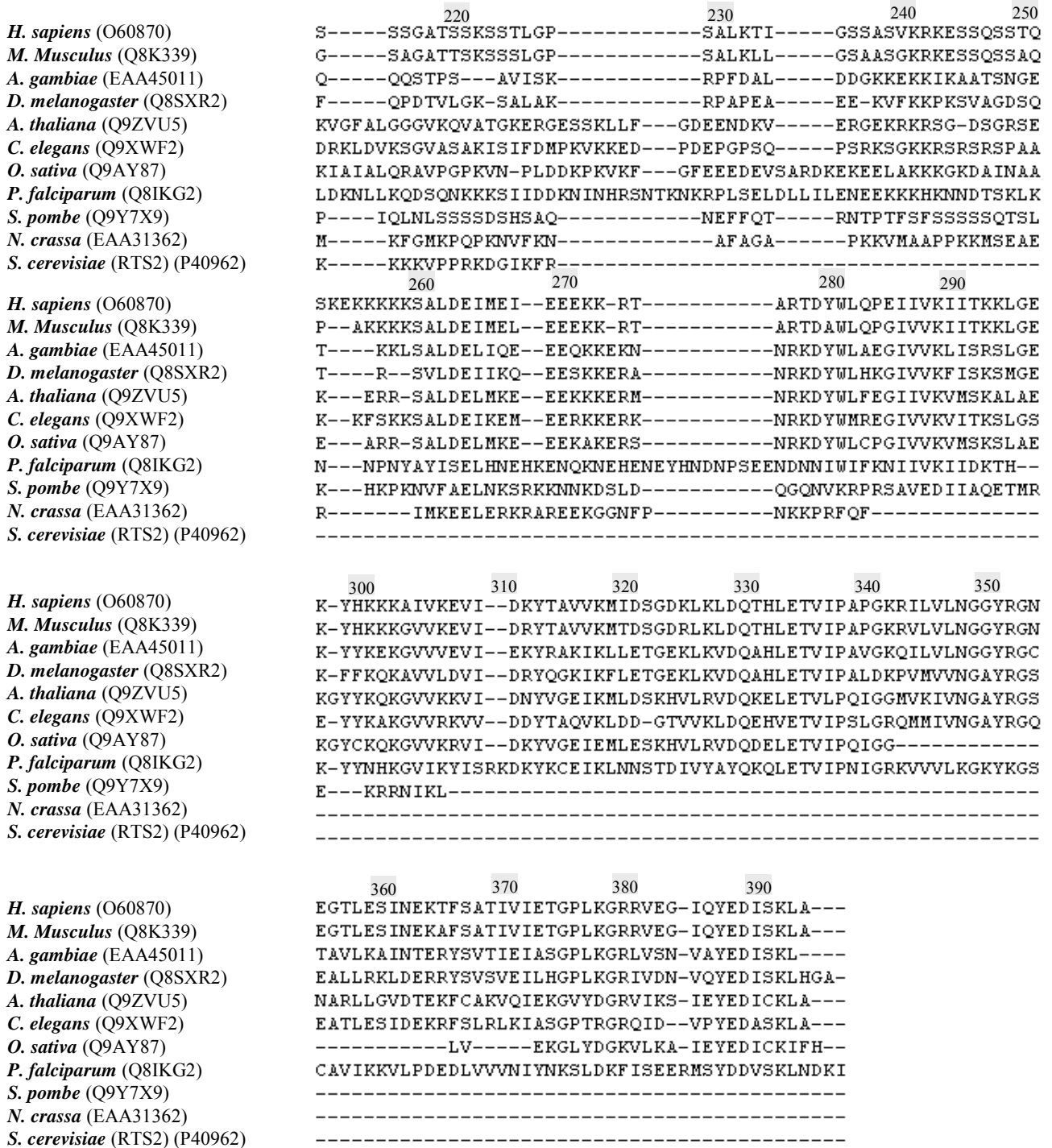


Figure 11: Conservation des protéines kin17 au cours de l'évolution. Alignement multiple de séquences des protéines kin17 (CLUSTAL W 1.74). La numérotation des acides aminés correspond à la protéine kin17 humaine.

Introduction

La séquence du cadre ouvert de lecture est très largement conservée au cours de l'évolution. On la retrouve dans de nombreux organismes eucaryotes très éloignés tels l'homme, la souris (82% d'identité nucléotidique), la mouche *Drosophila melanogaster* (68%), le nématode *Brugia malayi* (68%) et la levure *Schizosaccharomyces pombe* (40%). Cette large conservation de la structure primaire de la protéine kin17 (Figure 11) plaide pour une fonction essentielle pour la vie cellulaire. Cette hypothèse est corroborée par des travaux effectués au laboratoire sur la levure *S. pombe* et qui montrent que la protéine kin17 est essentielle dans cet organisme (Angulo, communication personnelle).

III.2. Régulation de l'expression de la protéine kin17

Le gène *KIN17* est sous le contrôle d'un promoteur de type « gène de ménage », ce qui lui confère une expression faible et ubiquitaire dans les tissus. Les transcrits du gène *HSAKIN17* sont trouvés dans tous les tissus analysés, le cœur, le muscle squelettique et les testicules présentant les niveaux d'ARNm de *HSAKIN17* les plus élevés (Kannouche et al., 2000).

La sur-expression transitoire des protéines kin17 de souris ou humaine bloque la prolifération de cellules tumorales humaines en culture (Biard et al., 1999; Kannouche and Angulo, 1999). A l'heure actuelle, seules les cellules de la lignée immortalisée mais non tumorigène HEK 293 tolèrent l'expression ectopique des protéines *MMUkin17* et *HSAkin17* et peuvent être maintenues en culture plusieurs mois après transfection. Cependant, la sur-expression de la protéine de souris entraîne des défauts importants de la croissance et des anomalies morphologiques du noyau dans ces cellules (Biard et al., 1999). L'expression du gène *KIN17* serait donc strictement régulée et liée à la prolifération cellulaire.

III.3. Domaines fonctionnels de la protéine kin17

La protéine kin17 présente trois domaines particuliers localisés dans des régions hydrophiles de la protéine (Figure 12) et dont la fonctionnalité a été démontrée chez la souris (Kannouche et al., 1997; Mazin et al., 1994b) :

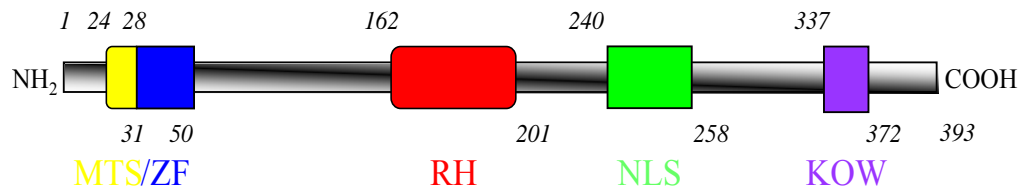


Figure 12: Domaines fonctionnels de la protéine $_{HSA}$ kin17. MTS: signal putatif de localisation mitochondrial; ZF: doigt de zinc; RH: domaine d'homologie à la protéine Rec A de *E. coli*; NLS: signal localisation nucléaire; KOW: motif KOW (Kyprides, Ouzounis, Woese).

- Un signal de localisation nucléaire en deux parties (NLS de l'anglais *nuclear localization signal*) est situé entre les acides aminés 240 et 258 de la protéine $_{HSA}$ kin17. Il assure la localisation nucléaire de la protéine. La protéine kin17 endogène possède en effet une localisation intranucléaire sous forme de foyers ponctuels (Kannouche et al., 2000).
- Un doigt de zinc (ZF de l'anglais *zinc finger*) de type $Cx_2Cx_{12}Hx_5H$ est situé entre les acides aminés 28 et 50 et permet l'interaction de la protéine kin17 avec l'ADN (Mazin et al., 1994b). Ce doigt de zinc est similaire à celui de la PARP, une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN.
- Une région de 40 acides aminés située dans le corps de la protéine (acides aminés 162 à 201) et qui est à 49% homologue à l'extrémité C-terminal de la protéine RecA (acides aminés 270 à 352) (Angulo et al., 1991). Cette région d'homologie explique la détection de kin17 par un anticorps dirigé contre RecA et est très fortement conservée au sein des protéines kin17. De plus, comme chez RecA, elle régule négativement les interactions de kin17 avec l'ADN. En effet, la délétion de ce fragment inhibe la réactivité croisée avec les

Introduction

anticorps dirigés contre la protéine RecA et entraîne une redistribution de la protéine kin17 dans le noyau au sein de larges agrégats (Kannouche et al., 1997).

Récemment, un motif KOW a été mis en évidence entre les acides aminés 330 et 363. Ce motif a été confirmé par l'analyse cristallographique de l'extrémité C-terminale de la protéine $_{HSA}$ kin17 (le Maire et al., 2006). Les motifs KOW seraient impliqués dans des interactions protéine/protéine et protéine/ARN dans le cadre du métabolisme de l'ARN (Steiner et al., 2002).

Mis à part la petite région d'homologie à la protéine RecA, aucune autre homologie avec d'autres protéines n'a pu être mise en évidence. En particulier, l'analyse de la séquence primaire de la protéine ne révèle aucune activité enzymatique connue.

III.4. Interaction de la protéine kin17 avec les acides nucléiques

A) Interaction de la protéine kin17 avec l'ADN, implication dans le métabolisme de l'ADN

Le doigt de zinc de la protéine kin17 est fonctionnel et permet l'interaction de la protéine avec l'ADN simple et double-brin. Cependant, la protéine $_{MMU}$ kin17, identique à 92% à la protéine humaine, se lie préférentiellement *in vitro* à l'ADN double brin ayant une topologie « courbe » (Mazin et al., 1994b). Cette structure de l'ADN est rencontrée au niveau des origines de réplication, des régions promotrices et des jonctions de recombinaison illégitime (pour revue voir Ohyama, 2001). L'interaction *in vitro* de la protéine kin17 purifiée dans *E. coli* et de l'ADN courbe a été précisée en utilisant des fragments d'ADN trouvés aux sites de recombinaisons illégitimes (Mazin et al., 1994a). Cette préférence pour l'ADN courbe et la parenté de la protéine kin17 avec la protéine RecA suggèrent un rôle potentiel dans la recombinaison.

Introduction

Parallèlement à l'interaction avec l'ADN, différents résultats conduisent à l'hypothèse d'un rôle de la protéine kin17 dans la croissance cellulaire et la réplication de l'ADN. En effet, la protéine kin17 se localise dans des foyers intranucléaires ponctuels. Cette localisation se retrouve pour de nombreuses protéines du métabolisme de l'ADN comme PCNA, RPA ou BRCA1 (Newport and Yan, 1996). La sur-expression de la protéine kin17 a un effet antiprolifératif (Biard et al., 1999; Kannouche and Angulo, 1999). Cependant, le niveau d'expression du gène *KIN17* est plus faible dans les cellules quiescentes, confluentes ou différenciées par rapport à des cellules en prolifération (Biard et al., 1997b; Kannouche et al., 1998; Pinon-Lataillade et al., 2004). En particulier, on observe une augmentation du transcrite du gène *MMUKIN17* dans des cellules de souris en culture, au niveau de la transition G1/S (Kannouche et al., 1998). De plus, la sur-expression de la protéine *MMUkin17* dans des cellules HeLa portant, intégré dans leur génome, un vecteur doté d'une origine de réplication SV-40 (*simian virus 40*), inhibe la réplication dépendant de l'antigène T de l'origine SV-40 (Kannouche and Angulo, 1999). La protéine kin17 pourrait donc avoir un rôle au sein du cycle cellulaire, au niveau du point de contrôle de la transition G1/S ou pendant la phase de synthèse de l'ADN.

B) Interaction de la protéine kin17 avec l'ARN, implication éventuelle dans la transcription et l'épissage

On a également proposé un rôle pour la protéine kin17 dans le contrôle de la transcription. Cette hypothèse est basée sur le fait que la protéine *MMUkin17* peut se substituer au facteur de transcription H-NS dans des souches bactériennes déficientes et peut activer ou réprimer la transcription de gènes appartenant à l'opéron H-NS (Timchenko et al., 1996). Le facteur de transcription H-NS, comme la protéine *MMUkin17*, se lie de façon préférentielle à l'ADN courbe.

Introduction

La présence d'un motif KOW à l'extrémité C-terminale de la protéine kin17 suggère un rôle dans la transcription. Une fraction de la protéine $_{MMU}kin17$ co-purifie avec l'ARN poly(A⁺) dans des testicules de souris adultes. L'association entre la protéine kin17 et l'ARN pourrait être directe, car la protéine kin17 murine traduite *in vivo* et la protéine kin17 humaine purifiée s'associent *in vitro* avec des homopolymères d'ARN (Pinon-Lataillade et al., 2004). En outre, deux équipes ont identifié la protéine kin17 comme appartenant au « *spliceosome* », le complexe chargé de l'épissage de l'ARN messenger (ARNm) (Jurica and Moore, 2003; Makarov et al., 2002; Makarova et al., 2004; Rappsilber et al., 2002). La protéine kin17 pourrait donc participer à l'étape d'épissage de l'ARNm. Cette hypothèse est confortée par des résultats récents obtenus au laboratoire montrant une interaction de la protéine kin17 avec différentes protéines du *spliceosome* (Pinon-Lataillade, article en préparation).

III.5. Implication de la protéine kin17 dans la réponse au stress génotoxique

Les protéines kin17 humaine et murine sont activées par différents agents génotoxiques tels les UVC, RI ou la bléomycine (Biard et al., 1997a; Kannouche et al., 1998; Masson et al., 2001).

A) La protéine kin17 dans la réponse cellulaire aux UVC

L'irradiation aux UVC de fibroblastes humains ou murins conduit à l'augmentation du transcrit du gène *KIN17* 7 heures après irradiation, avec un maximum atteint à 16 heures (Kannouche et al., 2000; Kannouche et al., 1998). L'induction du gène *KIN17* intervient donc après la phase précoce du NER. La protéine kin17 pourrait participer à un mécanisme, conservé chez les mammifères, permettant de prendre en charge les lésions résiduelles de l'ADN.

Introduction

Les fibroblastes primaires de patients XP-A et XP-C ne présentent pas d'augmentation de l'expression du gène *HSAKIN17* après irradiation aux UVC. Dans la lignée XP44RO issue d'une métastase testiculaire de mélanome de patient XP-C, l'induction du gène *KIN17* après UVC est restaurée par complémentation de la lignée avec un vecteur rétroviral portant l'ADNc du gène *XPC* (Masson et al., 2003). Des résultats similaires ont été observés chez la souris en comparant des fibroblastes normaux et *XPA^{-/-}* (Blattner et al., 2000). L'activité des protéines du NER XPA et XPC est donc nécessaire à la réponse du gène *KIN17* après irradiation aux UVC. C'est le premier cas rapporté d'une réponse induite par les UV et nécessitant un NER fonctionnel.

B) La protéine kin17 et la réponse cellulaire aux radiations ionisantes

Dans des cellules de rat BP (cellules épithéliales issues d'une culture de poumons de rat exposés au benzo[a]pyrène (Le Rhun et al., 1994)) de génotype *p53* normal, on observe une induction précoce de la protéine kin17 dès 30 min après irradiation à 2 et 6 Gy. Les cellules tumorigènes dérivées BP-T, qui présentent une mutation homozygote du gène *p53*, ont un niveau basal de kin17 plus élevé que dans le génotype normal et la protéine n'est pas induite après irradiation (Biard et al., 1997a). La protéine kin17 pourrait donc participer à la réponse cellulaire aux agents génotoxiques de manière *p53* dépendante chez le rat.

Dans des cellules de mélanome humain (MeWo), l'expression du gène *HSAKIN17* est induite après irradiation γ ou traitement à la bléomycine, un radio-mimétique induisant des SSB et des DSB (Masson et al., 2001). L'irradiation à 15 Gy de cellules MeWo entraîne une augmentation du transcrite du gène *HSAKIN17* 30 min après irradiation avec un maximum correspondant à 3,4 fois le niveau basal atteint 3 heures après irradiation. Le niveau basal est retrouvé 24 heures après irradiation. Après traitement à la bléomycine (40 μ M), l'ARNm de *HSAKIN17* augmente à 3 heures pour atteindre son maximum 16 heures après traitement.

Introduction

Cependant, l'augmentation de l'expression du gène *HSAKIN17* après irradiation ne dépend pas du phénotype *p53* des cellules traitées.

Un des objectifs de mon travail de thèse a été de caractériser la réponse de la protéine *HSAkin17* dans des cellules humaines exposées à une irradiation ionisante.

Résultats

Article 1

Article I

Les radiations ionisantes entraînent l'augmentation de la quantité de protéine kin17 associée à la chromatine dans des cellules humaines. D.S.F.

Biard, L. Miccoli, E. Despras, Y. Frobert, C. Créminon and J.F. Angulo. J. Biol. Chem. 277, 19156–19165. 2002.

Jusqu'à présent, les résultats concernant l'implication de la protéine kin17 dans la réponse aux dommages de l'ADN, en particulier après RI, ont été obtenus dans des cellules de rongeur particulières (cellules de rat BP) ou dans des cellules humaines mais par analyse du niveau d'ARNm du gène *HSAKIN17*. La purification de protéine kin17 humaine recombinante a permis la production d'anticorps monoclonaux et l'analyse directe du taux protéique de *HSAkin17* dans des cellules humaines en culture.

1. La protéine *HSAkin17* s'associe à la chromatine *in vivo*.

Des expériences de pontage *in vivo* sur des cellules HeLa ont montré qu'une fraction de la protéine *HSAkin17* est directement associée à la chromatine. Cette observation confirme dans des cellules humaines en culture les résultats obtenus *in vitro* sur les interactions entre la protéine *MMUkin17* et l'ADN (Mazin et al., 1994a; Mazin et al., 1994b).

2. La fraction de la protéine *HSAkin17* associée à la chromatine augmente aux temps tardifs après RI dans les cellules de la lignée RKO.

La protéine *HSAkin17* existe dans la cellule sous une forme soluble et sous une forme étroitement associée aux structures nucléaires et résistant à l'extraction par un détergent. La fraction de la protéine *HSAkin17* associée à la chromatine augmente de façon dépendant de la dose 24 h après irradiation γ dans des cellules RKO (carcinome colorectal). La protéine *HSAkin17* se concentre alors dans des foyers intra-nucléaires et co-localise partiellement avec la protéine RPA. Or la majorité des dommages de l'ADN induits par l'irradiation est réparée en 5 heures (Nunez et al., 1995). Ce résultat suggère que la protéine *HSAkin17* se localise aux sites de dommages non réparés de l'ADN aux temps tardifs après irradiation γ .

3. La réduction du niveau d'expression de la protéine *HSAkin17* dans les cellules RKO perturbe leur progression dans le cycle cellulaire et inhibe la prolifération.

Nous avons obtenus des clones issus de la lignée RKO et exprimant un transcrit « antisens » de l'ADNc du gène *HSAKIN17* (cellules RASK.5 et RASK.13 pour *RKO antisense kin17* clones 5 et 13). La réduction du niveau d'expression de la protéine *HSAkin17* s'accompagne d'une réduction de la croissance et de la prolifération cellulaire, ainsi que d'une accumulation des cellules en début et milieu de la phase S du cycle cellulaire.

Résultats

Hypothèse :

Dans ce premier article, nous avons émis l'hypothèse que la protéine HSAkin17 pourrait être impliquée dans les processus métaboliques de l'ADN consécutifs à une irradiation, en participant par exemple au couplage entre réplication et réparation.

Ionizing Radiation Triggers Chromatin-bound kin17 Complex Formation in Human Cells*

Received for publication, January 11, 2002, and in revised form, February 8, 2002
Published, JBC Papers in Press, March 5, 2002, DOI 10.1074/jbc.M200321200

Denis S. F. Biard^{‡§}, Laurent Miccoli[‡], Emmanuelle Despras[‡], Yveline Frobert[¶],
Christophe Créminon[¶], and Jaime F. Angulo[‡]

From the [‡]Commissariat à l'Énergie Atomique, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, Département de Radiobiologie et de Radiopathologie, Direction des Sciences du Vivant, Fontenay-aux-Roses 92265, France and the [¶]Commissariat à l'Énergie Atomique, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, Département de Recherche Médicale, Direction des Sciences du Vivant, CE Saclay, Gif sur Yvette 91191, France

The human DNA-binding *HSA*kin17 protein cross-reacts with antibodies raised against the stress-activated *Escherichia coli* RecA protein. We show here that *HSA*kin17 protein is directly associated with chromosomal DNA as judged by cross-linking experiments on living cells. We detected increased amounts of DNA-bound *HSA*kin17 protein 24 h after γ irradiation, with 2.6-fold more *HSA*kin17 molecules after 6 Gy of irradiation (46,000–117,000 molecules). At this time we observed that highly proliferating RKO cells displayed the concentration and co-localization of *HSA*kin17 and replication protein A in nucleoplasmic foci. Our results suggest that 24 h post-irradiation *HSA*kin17 protein may localize at the sites of unrepaired DNA damages. RKO clones expressing an *HSA*KIN17 antisense transcript (RASK.5 and RASK.13 cells) revealed that reduced *HSA*kin17 protein levels are correlated with a decrease in clonogenic cell growth and cell proliferation, as well as an accumulation of cells in early and mid-S phase. Taken together our observations support the idea that *HSA*kin17 protein is a DNA maintenance protein involved in the cellular response to the presence of DNA damage and suggest that it helps to overcome the perturbation of DNA replication produced by unrepaired lesions.

Ionizing radiation (IR)¹ induces a large range of DNA damage, including DNA double-strand breaks (DSBs), which represent a major threat to the integrity of mammalian genomes through chromosomal breakages and rearrangements (1). In mammalian cells, DSBs are repaired either by the homologous recombinational repair or by nonhomologous end joining (2, 3). DSB repair pathways are usually characterized by the sequestration of many factors into discrete nuclear foci at the sites of DNA lesions and until completion of DSB repair (4). Some of the proteins belonging to these pathways act as a sensor for DNA damage or are involved in cell cycle checkpoints. This is

the case for the histone H2AX, 53BP1, RPA, Rad51, BRCA1, or the Mre11-Rad50-Nbs1 nuclease complex (4–8). For instance, the tumor suppressor gene *BRCA1*, previously involved in the regulation of the replication checkpoint and transcription-coupled repair, forms a multiprotein complex with Mre11-Rad50-Nbs1 and other proteins following irradiation, termed as BASC (BRCA1-associated surveillance complex), which may serve as a sensor of DNA lesions (8, 9).

In this cascade of IR-induced proteins forming nuclear foci, we characterized here the *HSA*kin17 protein. Murine *MMU*kin17 protein was identified on the basis of a cross-reactivity with antibodies raised against the *Escherichia coli* RecA protein, a key enzyme in homologous recombination and recombinational repair of damaged DNA (10, 11). This cross-reactivity stemmed from a sequence homology stretching over 39 amino acids highly conserved during evolution (12). This domain is located in the carboxyl-terminal region of the *E. coli* RecA protein, a region involved in the regulation of DNA binding (13). Recent data show that kin17 proteins are highly conserved during evolution.² In particular, a homologous protein has been identified in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. This conservation from yeast to human points to an essential role of kin17 proteins. For instance, the expression of kin17 proteins is preserved in the phylogeny of the brain of higher vertebrates (14, 15). To date, major features of the kin17 protein are its abilities (i) to bind *in vitro* to double-stranded DNA and preferentially to DNA with a curved topology stretching over illegitimate recombination junctions (16, 17), (ii) to complement the functions of the H-NS (histone-like nucleoid structure) protein transcription factor in deficient bacterial strains in controlling gene expression (18), and (iii) to be a stress-activated protein recruited during the cellular response to ionizing radiation or UVC (19, 20). In particular, UVC irradiation induced a stabilization of *MMU*KIN17 mRNA from 80 min to more than 8 h in mouse fibroblasts (21). Interestingly, Δ XPA mouse cells, which are unable to repair UVC-induced DNA damage, accumulated *MMU*KIN17 mRNA at lower doses of UVC (5–10 J/m²) than repair-proficient mouse fibroblasts (20–30 J/m²), suggesting that DNA damage *per se* is required for the stabilization of *MMU*KIN17 mRNA (21).

In human cells, the *HSA*KIN17 gene is localized on chromosome 10 at position p15-p14. *HSA*KIN17 transcripts were ubiquitously found at low levels in all human organs tested, displaying an expression profile akin to that of housekeeping genes. Heart, skeletal muscle, and testis displayed the highest *HSA*KIN17 mRNA levels compared with the other tissues ana-

* This work was supported by Electricité de France Contract 8702. 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.

§ To whom correspondence should be addressed: CEA-DSV-DRR, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, BP 6, 92265 Fontenay aux Roses, France. E-mail: biard@dsvidf.cea.fr.

¹ The abbreviations used are: IR, ionizing radiation; DSB, double-strand break; RPA, replication protein A; EBV, Epstein-Barr virus; Gy, gray; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; mAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate-buffered saline; DMS, dimethylsulfate; BrdUrd, bromodeoxyuridine; PCNA, proliferating cell nuclear antigen.

² J. F. Angulo, unpublished result.

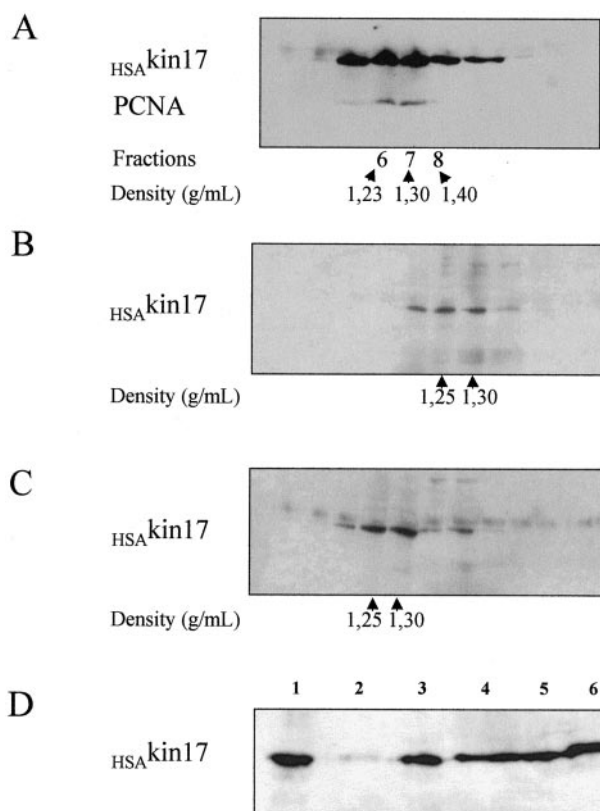


FIG. 1. *HSA*kin17 protein binds directly to chromosomal DNA *in vivo*. *In vivo* cross-linking with formaldehyde (1%, 3 min) was performed in HeLa cells. After cross-linking, the nuclei were isolated and lysed, and DNA-protein complexes were purified by equilibrium centrifugation in two consecutive cesium chloride gradients. The proteins were analyzed onto a 10% SDS-PAGE. *A*, purification of DNA-protein complex from proliferating HeLa cells after the first equilibrium centrifugation revealed both *HSA*kin17 and PCNA in the same fractions. *B*, DNase-treated fractions 6–8 were pooled, recentrifuged on an isopycnic cesium chloride gradient, fractionated, and analyzed as above. *C*, as in *B* with HeLa cells treated with 0.2 μ M nocodazole for 16 h. *D*, DMS treatment demonstrates a direct binding of *HSA*kin17 to DNA. Purified DNA-protein complexes from a second CsCl gradient were treated with DMS according to the procedure described under “Materials and Methods.” Lane 1, mock treated cells + formaldehyde cross-link. Lane 2, mock treated cells + formaldehyde cross-link + DMS. Lane 3, nocodazole treated cells + formaldehyde cross-link. Lane 4, input lane 1. Lane 5, input lane 2. Lane 6, 2 ng of purified His₆-*HSA*kin17.

lyzed (12). *HSA*kin17 protein expression is associated with the differentiation program of human keratinocytes cultivated in the *in vitro* reconstructed skin model (22). Mouse and human kin17 proteins are able to arrest cell proliferation of human tumor cells when their expression is transiently increased after transfection (23).³ Only the immortalized but not tumorigenic HEK 293 cell line tolerates ectopic expression of either *MMU*kin17 or *HSA*kin17 proteins and can be propagated in mass culture for several weeks. However, the constitutive overexpression of *MMU*kin17 protein in HEK 293 cells entailed major growth defects and nuclear abnormalities (23).

We show here for the first time that the *HSA*kin17 protein is mainly present in the nuclear compartment associated with nuclear structures in human cells. We demonstrate that a fraction of nuclear *HSA*kin17 protein is directly associated with DNA. *HSA*kin17 protein is localized in discrete nuclear foci spread throughout the nucleoplasm. Strikingly, γ irradiation induces an increase in the DNA-bound fraction of *HSA*kin17 protein that correlates with the appearance of foci containing

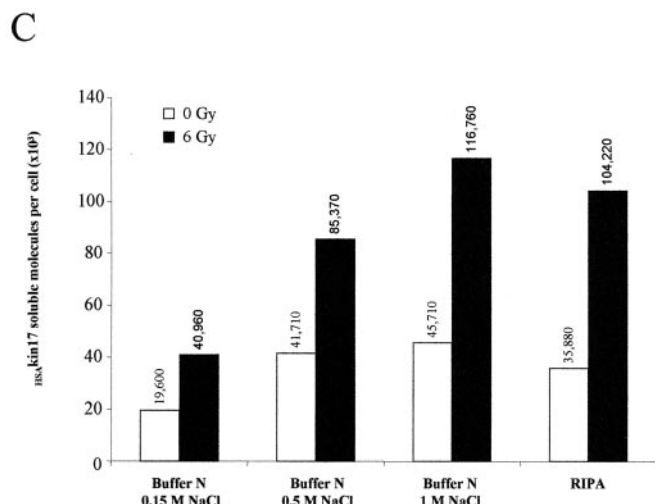
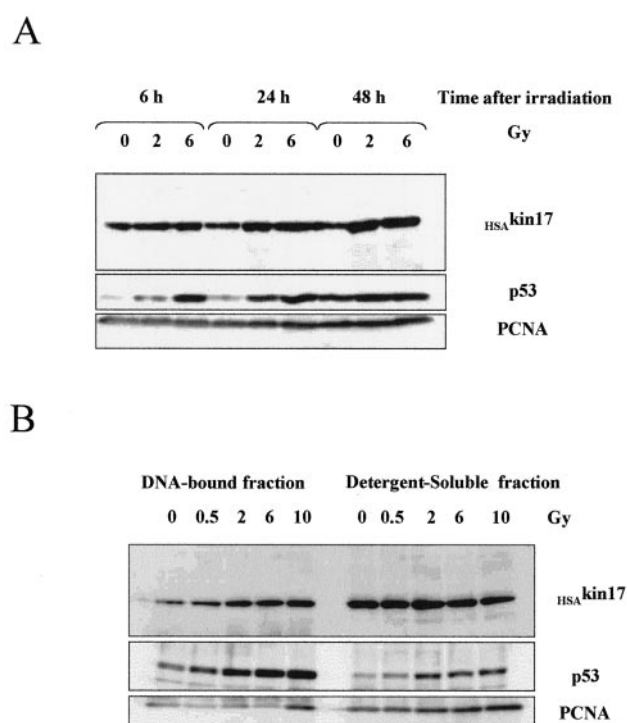


FIG. 2. γ irradiation increases the DNA-bound fraction of *HSA*kin17 protein. RKO cells were seeded 3 days before irradiation. 24 h after irradiation at the indicated doses, cells were trypsinized, counted, and frozen. *A*, frozen cells were lysed in Laemmli buffer and boiled for 10 min at 100 °C. The equivalent of 33,000 cells was loaded onto a 10% SDS-polyacrylamide gel. *B*, frozen cells were lysed in buffer N as indicated under “Materials and Methods.” Detergent-soluble and DNA-bound proteins were collected by centrifugation (15 min, 20,000 \times g) and denatured with Laemmli buffer. *C*, R482.1 cells carrying the pEBVCMV vector were treated as described for *A* except for lysis. Fresh extracts were lysed either in buffer N with 0.15, 0.5, or 1 M NaCl or in RIPA buffer. Only soluble proteins were analyzed by ELISA.

both *HSA*kin17 protein and replication protein A (RPA) 24 h after IR. To ascertain the requirement of *HSA*kin17 in the immortalized phenotype, we have expressed *HSA*KIN17 antisense transcript in RKO carcinoma cells. These RKO cells expressing the antisense *HSA*KIN17 (called RASK cells) displayed markedly reduced proliferation rates associated with a defect in S phase progression. All of our observations support the idea that *HSA*kin17 protein is involved in the cellular re-

³ D. S. F. Biard, unpublished data.

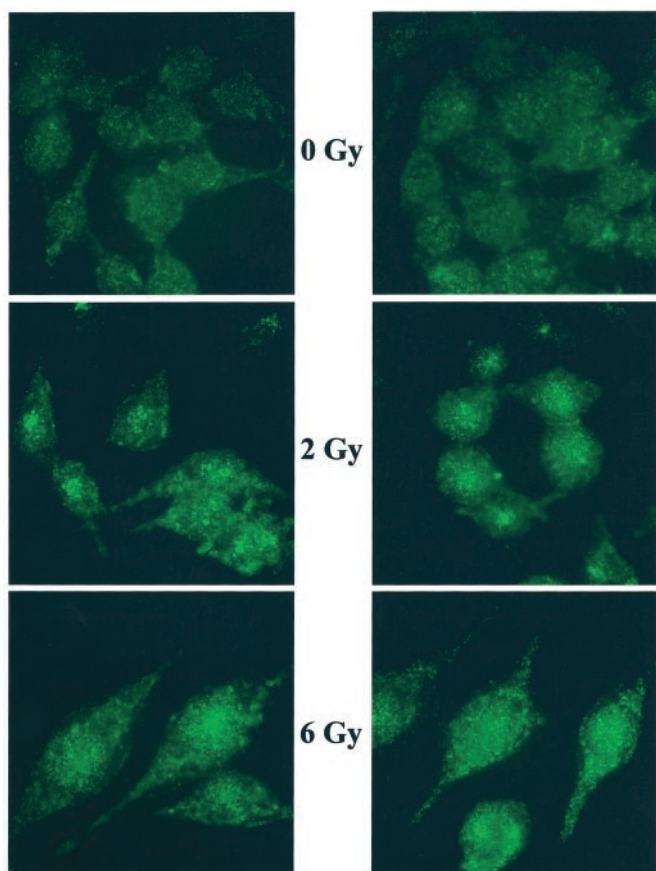


FIG. 3. Detection of *HSA*kin17 protein relocation by indirect immunofluorescence 24 h after irradiation. RKO cells were seeded 3 days before irradiation and fixed with acetone/methanol 24 h after irradiation (2 and 6 Gy). *HSA*kin17 protein was revealed using the monoclonal antibody mAb K36 and a Cy2TM-conjugated affinity-purified goat anti-mouse IgG. Two digitized images of representative cells/dose are shown at a magnification of 500 \times .

sponse to the presence of DNA damage and suggest that it may help to overcome the DNA replication arrest produced by unrepaired lesions.

MATERIALS AND METHODS

Cell Cultures—Human colorectal carcinoma RKO cells were obtained from M. F. Poupon. Human cervical carcinoma HeLa cells were obtained from E. May. The cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 units/ml of penicillin, and 100 μ g/ml of streptomycin, under 5% CO₂.

Cloning of EBV vectors carrying *HSA*KIN17 cDNA in an antisense orientation has been performed as described elsewhere (23). Transfected RKO cells carrying EBV plasmids were propagated in culture in the presence of 500 μ g/ml hygromycin B (Invitrogen). We used the following vectors: pEBVCMV (pB482) and pEBVCMVas_{HSA}Kin17 (pB399as). Transfection experiments were carried out using LipofectAMINE 2000 (Invitrogen). RKO clones transfected with the pB399as EBV vector carrying the *HSA*KIN17 cDNA-SV40 polyadenylation signal cartridge in an antisense orientation were termed RASK, for RKO antisense *HSA*KIN17 cDNA. Control clones carrying the pB482 plasmid were named R482.

The cells were irradiated using a ¹³⁷Cs source (IBL 637 CisBio International) with a dose rate of 1.97 Gy/min. For clonogenic cell growth, the RKO cells were seeded as indicated in the table and cultivated for 2 weeks in the presence of hygromycin B. Growing clones were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with methylene blue, and the clones containing more than 50 cells were counted. Each experiment was done three times.

Monoclonal Antibodies against *HSA*kin17 Protein and ELISA—Monoclonal antibodies (mAb K3, mAb K31, mAb K36, and mAb K58) were

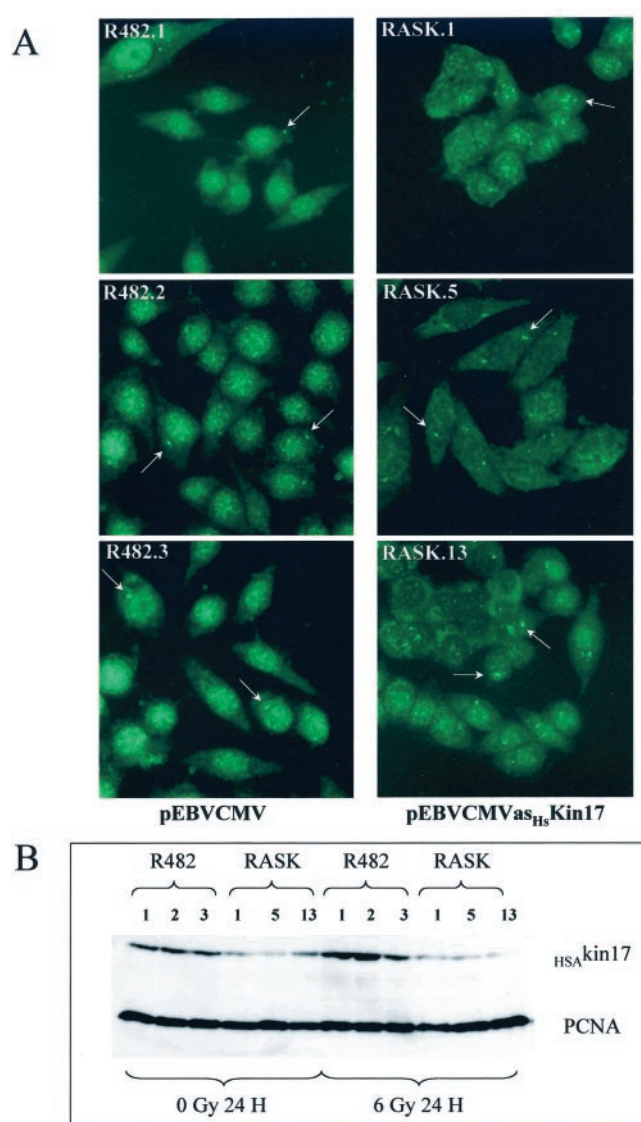


FIG. 4. RKO cells displaying low levels of *HSA*kin17 protein fail to accumulate *HSA*kin17 protein after ionizing radiation. **A**, 7 weeks after transfection and selection in the presence of 500 μ g/ml hygromycin B, RASK and R482 cells were fixed, and endogenous *HSA*kin17 was revealed using the mAb K36 antibody as described for Fig. 3. The arrows indicate an extranuclear structure close to the nuclei. **B**, 10 weeks after transfection, 0.2×10^6 cells were seeded in 6-cm dishes in the presence of 500 μ g/ml hygromycin B and irradiated 3 days later at 1.97 Gy/min. 24 h later, the cells were trypsinized, counted, and lysed with RIPA buffer as indicated under "Materials and Methods." The protein of 60,000 cells was loaded onto a 10% SDS-polyacrylamide gel.

obtained after inoculation of recombinant His-tagged human *HSA*kin17 protein (His₆-*HSA*kin17) purified by metal chelation and heparin column chromatography from baculovirus-infected Sf9 *Spodoptera frugiperda* cell extracts and injected in mice as described previously.⁴ We used either hybridoma supernatants (mAb K36) or IgG anti-*HSA*kin17 protein (Ig K36; Ig K58) purified from ascites fluid. Purified immunoglobulin from rabbit polyclonal antibody anti-His₆-*HSA*kin17 (IgG 77P) was obtained as described elsewhere.⁴

A conventional two-site immunometric assay (sandwich immunoassay) based on two specific monoclonal antibodies recognizing nonoverlapping epitopes was developed essentially as described by Grassi *et al.* (24). We chose the mAb K3 and mAb K31 monoclonal antibodies, the

⁴ L. Miccoli, D. S. F. Biard, C. Créminon, and J. F. Angulo, submitted for publication.

TABLE I
RASK cells display decreased plating efficiencies and reduced cell growth

23 weeks after transfection, the cells were seeded as indicated in the presence of 500 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin B. The clones were fixed, stained, and counted 16 days after seeding. Control clone, R482.1 cells.

Cell line	Number of cells seeded	Plating efficiency \pm S.D.
	cells/cm ²	%
RKO	10	53.2 \pm 5.3
Control clone	10	70.8 \pm 4.5
RAS.5	33	11.6 \pm 1.9
RAS.13	100	5.3 \pm 4.9

mAb K3 being conjugated to acetylcholinesterase as reporter enzyme (24).

Indirect Immunofluorescence Staining—The cells were plated at 5,000 cells/cm² on glass coverslips and treated. At the indicated times after treatment, the cells were fixed for 5 min in 70% acetone, 30% methanol at -20°C . The primary antibodies were diluted in the incubation buffer B (0.5% Tween 20, 12% bovine serum albumin, 0.036% Na₂S₂O₅ in PBS) and incubated for 45 min. The following antibodies were used: hybridoma supernatant mAb K36 anti-*HSA*kin17 (diluted by half), purified Ig K36 anti-*HSA*kin17 (450 ng/ml), purified rabbit immunoglobulin IgG 77P against *HSA*kin17 (5 $\mu\text{g/ml}$), and anti-RPA70 (directed against the 70-kDa subunit; mouse monoclonal NA13 antibody, 500 ng/ml; Oncogene Research Products). Primary antibodies were revealed with either Cy2TM-conjugated affinity-purified goat anti-mouse IgG or Cy3TM-conjugated affinity-purified goat anti-rabbit IgG (Jackson Laboratories, Inc.; 2 $\mu\text{g/ml}$). The cells were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole (4 $\mu\text{g/ml}$). Immunofluorescence staining was viewed using a Zeiss Axiophot 2 epifluorescence microscope coupled to a cooled Sensys 1400 camera from Photometrics monitored by the Zeiss KS300 3.0 program. The use of a CCD camera-based imaging system allows high resolution and a wide dynamic range for acquiring and analyzing fluorescent staining. Representative fields for each cell line are presented. Irradiation experiments were reproduced more than 10 times under different culture conditions.

Protein Extraction and Western Blot—The cells were seeded at 5,000 cells/cm² 3 days before trypsinization and treated as indicated. The cells were lysed using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% IgepalTM, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate, protease inhibitor mixture from Roche Molecular Biochemicals) or buffer N (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCl, 1% IgepalTM, 1 mM EDTA, protease inhibitor mixture from Roche Molecular Biochemicals), as indicated in the legends of the figures. The lysates were kept on ice for 30 min with the buffer N, and soluble proteins recovered after centrifugation (20,000 \times *g* for 15 min) were quantified by Bradford assay (Bio-Rad) and analyzed by ELISA or Western blot. The remaining pellets were denatured in Laemmli sample buffer, boiled for 10 min at 100°C , and analyzed by Western blot.

Purified IgG Ig K36 and Ig K58 were used at a concentration of 25 ng/ml. Other antibodies used were anti-p53 protein (hybridoma supernatant mAb DO-7 antibody diluted to 1:2000). DO-7 antibody was kindly provided by Dr. E. May. Anti-PCNA (mouse monoclonal PC10 antibody diluted to 50 $\mu\text{g/ml}$; Novo Castra) and anti-RPA70 (25 ng/ml) were also used.

In Vivo Cross-linking and Preparation of DNA-Protein Complexes—The procedure has been described by Göhring and Fackelmayer (25). Briefly, HeLa cells were washed once with PBS and incubated for 3 min at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (without serum) containing 1% formaldehyde. Cross-linked cells were recovered by centrifugation (5 min at 750 \times *g*). The cells were resuspended in buffer RSB (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, and 3 mM MgCl₂, pH 8.0) and homogenized in a chilled Dounce homogenizer. The nuclei were collected by centrifugation (8 min, 750 \times *g*), and the unbound proteins were extracted in buffer E (10 mM Tris-HCl, 10 mM Na₂S₂O₅, 1 M NaCl, 0.1% IgepalTM, 1 mM EDTA-KOH, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 8.0). After extraction, the nuclei were pelleted as above, resuspended in 0.1 M NaCl, and lysed at a final concentration of 2% sodium sarkosyl. The samples were layered on a preformed CsCl step gradient (3 ml of 1.75 g/ml CsCl solution, 3.5 ml of 1.5 g/ml CsCl solution, and 3 ml of 1.3 g/ml CsCl solution). All CsCl solutions were prepared in 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-KOH, and 0.5% sodium sarkosyl. After centrifugation for 24 h at 200,000 \times *g* at 20°C and fractionation from the top, DNA-protein complexes sediment at a density of \sim 1.3 g/ml.

Aliquots of the fractions were sonicated, and the density of individual fractions was determined. For RNase digestion, the pooled fractions were dialyzed against 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, and 2 mM EDTA before 5 μg of DNase-free RNase was added for 30 min at room temperature. Solid CsCl was added to a density of 1.5 g/ml in a final volume of 5 ml, and the sample was centrifuged for 72 h at 250,000 \times *g* at 20°C . The gradient was fractionated and analyzed. The DNA-containing fraction was briefly sonicated and desalted by gel filtration on Sephadex G25 columns. Cross-links were cleaved by incubation at 100°C for 10 min in Laemmli sample buffer and analyzed on SDS-polyacrylamide gels.

Additional dimethylsulfate (DMS) treatment was done after the second CsCl gradient as follows. The DNA-containing fraction was sheared by sonication and then desalted over a Sephadex G25 column into 30 mM sodium phosphate, pH 7.4, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM EGTA. After desalting, $\frac{1}{10}$ volume of 10.5 M DMS was added for 18 h on ice, then for 8 h at 45°C . $\frac{1}{10}$ volume of (fresh) 0.2 M NaBH₄ was then added for 30 min on ice. After incubation, SDS was added to 1% final concentration, and the sample was boiled for 60 min. After boiling, the samples were treated once more with NaBH₄ at 4°C , and DNA-protein complexes were analyzed by SDS-PAGE.

Flow Cytometry Analysis of BrdUrd Incorporation—The cells were plated at a density of 5,000 (control R482) or 10,000 (RASK) cells/cm² 3 days before irradiation. 24 h later, the cells were pulse-labeled with 30 μM BrdUrd for 15 min, washed in PBS, and collected by trypsinization. The cells were resuspended in PBS and fixed with ethanol (75%). BrdUrd-labeled cells were detected as described by Bensaad *et al.* (26). Briefly, the nuclei were isolated following treatment with pepsin 0.5% in 30 mM HCl for 20 min, and cellular DNA was partially denatured with 2 N HCl for 20 min at 37°C . After extensive washing, the cells were incubated successively with rat anti-BrdUrd antibodies for 1 h at room temperature and with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rat IgG secondary antibody for 30 min at room temperature. Then they were washed again twice in PBS and stained with 25 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide for 20 min at room temperature. The data were collected using a FACsort flow cytometer (BD Pharmingen).

RESULTS

Association of Human *HSA*kin17 Protein with Chromosomal DNA *In Vivo*—Mazin *et al.* (16, 17) demonstrated that *in vitro* mouse *MMU*kin17 protein recognizes DNA, particularly double-stranded DNA with a curved topology. In agreement with these results, we have observed that most *HSA*kin17 protein was localized in nuclei of different cultured human cell lines (data not shown). We then tested whether *in vivo* endogenous human *HSA*kin17 protein could be associated with chromosomal DNA. We used a method based on a limited cross-linking of living HeLa cells with formaldehyde to stabilize DNA-protein interactions prior to the extraction (25). This method minimized the formation of nonspecific cross-links and further excluded noncross-linked material by two consecutive cesium chloride density gradient centrifugations. Equilibrium density gradient centrifugation separates cellular components according to their density. Under these experimental conditions, DNA-protein complexes exhibited a density near to that of native chromatin (1.4 g/ml). Covalent bonds introduced by formaldehyde are reversible by boiling in SDS-containing buffers, thus allowing the analysis of proteins by SDS-PAGE. After a first centrifugation, we observed a co-migration of *HSA*kin17 and PCNA proteins as components of a high molecular weight complex displaying similar densities (Fig. 1A). Fractions 6–8 containing DNA were pooled and purified by a second isopycnic centrifugation. Most *HSA*kin17 protein was detected in fractions corresponding to DNA-protein complexes, suggesting that *HSA*kin17 protein was bound *in vivo* to DNA in HeLa cells (Fig. 1B).

We asked whether *HSA*kin17 protein is associated with the chromatin in a cell cycle-dependent manner. HeLa cells were treated with a microtubule poison (nocodazole) to trigger an anaphase arrest and to trap cells into mitosis (27). HeLa cells arrested in G₂-M retained *HSA*kin17 tightly associated with the

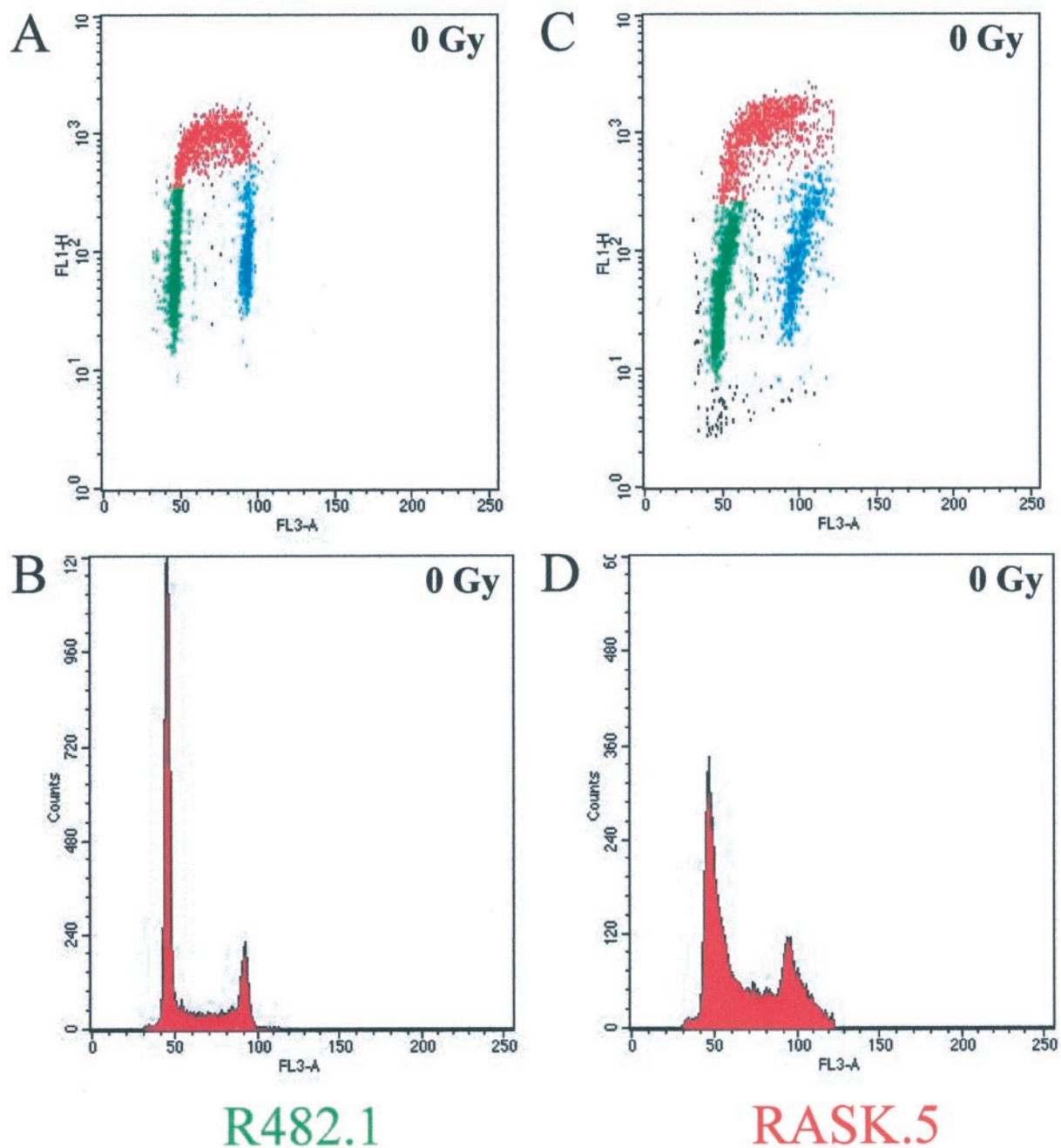


FIG. 5. Flow cytometric analysis of BrdUrd incorporation in RASK.5 cells versus R482.1 cells. The cells were seeded 3 days before irradiation (6 Gy) and analyzed 24 h later. BrdUrd (30 μ M) was added to the culture medium for 15 min before fixation and labeling with fluorescein isothiocyanate-conjugated BrdUrd antibody and counterstaining with propidium iodide as described under "Materials and Methods." A, C, E, and G, BrdUrd incorporation is shown as log fluorescence using the FL1-H channel and relative DNA content (propidium iodide) is measured by FL3-A. B, D, F, and H, cell cycle using propidium iodide (FL3-A channel). The experiments were done twice with the different clones isolated.

chromatin structure, as did mock treated cells (Fig. 1C). Therefore, *HSAkin17* remains associated with the chromatin structure in both proliferating or G₂-M-arrested cells. Hence, *in vivo* association of *HSAkin17* protein with DNA structures was independent of the cell cycle.

We next examined whether *HSAkin17* protein was directly bound to DNA. We used DMS to convert heat-reversible methylene bonds induced by formaldehyde to stable DNA-protein covalent bonds that are resistant to boiling in SDS-containing buffers. Under these conditions, if *HSAkin17* protein is directly associated with the chromatin, the DNA-protein complex is stabilized and cannot be separated by SDS-PAGE. Conversely, if *HSAkin17* protein is linked to pro-

teins of the chromatin, covalent methylene bonds are reversed by boiling, and the protein can migrate in SDS-PAGE. After DMS treatment the *HSAkin17* band disappeared, showing that *in vivo* most *HSAkin17* protein is directly linked to DNA (Fig. 1D, lane 2).

*γ Irradiation Increases the Amount of *HSAkin17* Protein Bound to DNA*—Because *HSAkin17* is a chromatin-bound protein, we next asked whether γ irradiation could preferentially increase the *HSAkin17* fraction tightly associated with DNA. First, experiments were carried out to estimate the kinetics of induction of the total *HSAkin17* protein content in RKO cells. RKO cells were seeded 3 days before irradiation and γ -irradiated at 50% of confluence to avoid any effect caused

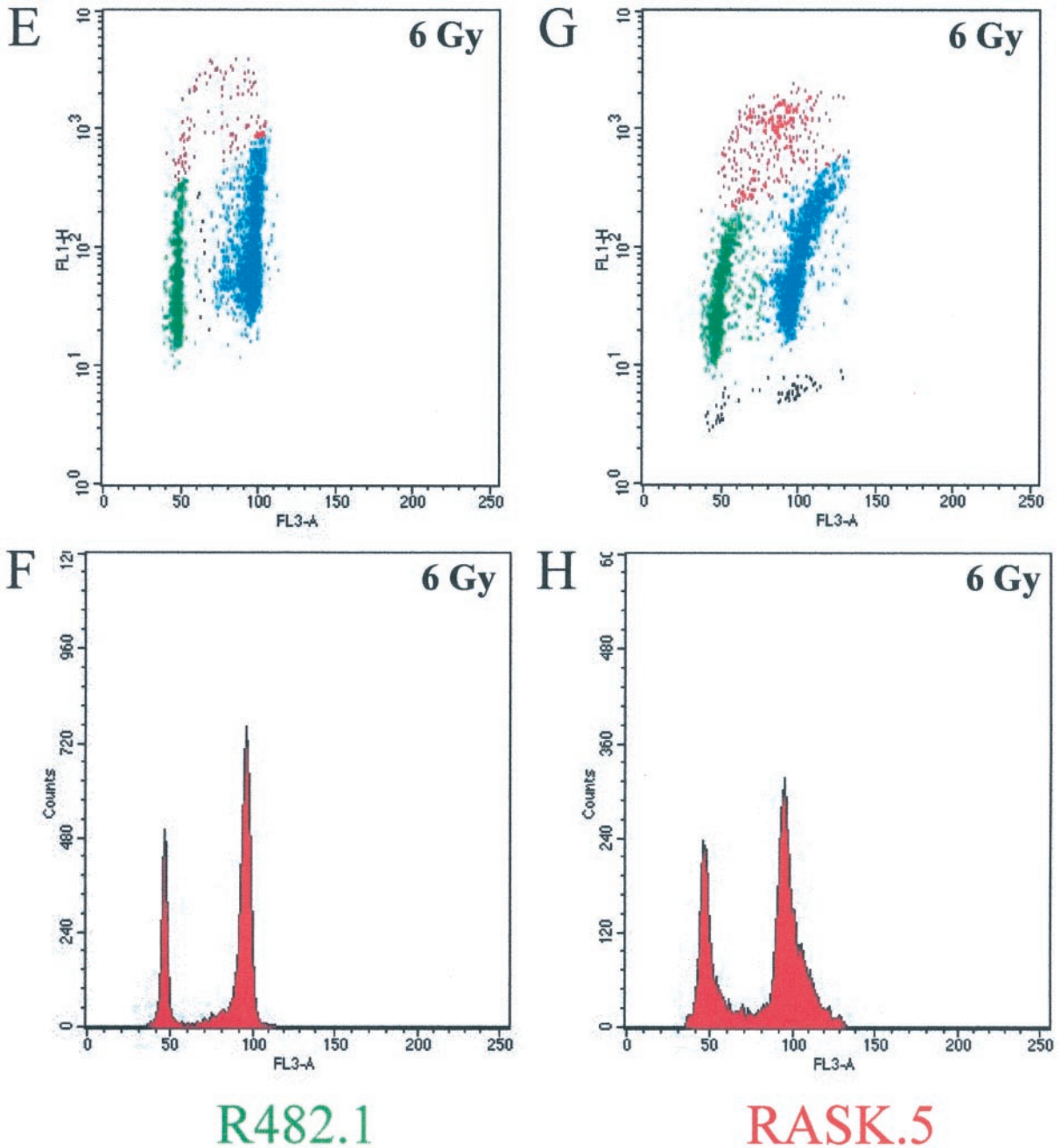


FIG. 5—continued

by serum stimulation. Under these conditions, about 25% of the cells were in S phase as determined by BrdUrd pulse incorporation and flow cytometry analysis (see Fig. 5A and data not shown). Total proteins were recovered, and the HSA_{kin17} protein level was assessed at different times following irradiation. Although a tremendous induction of p53 was always observed 6 and 24 h after irradiation, we usually observed an increased HSA_{kin17} protein level only 24 and 48 h after irradiation (Fig. 2A). At these times, most of the RKO cells were arrested in the G₂ phase, as evidenced by flow cytometry (see Fig. 5E and data not shown). Under these conditions, the PCNA protein level remained unchanged (Fig. 2A).

Second, we assessed the level of HSA_{kin17} protein anchored to the DNA structure 24 h after IR. In this approach, we used a lysis buffer containing 1% IgepalTM (buffer N) to discrimi-

nate between cytoplasmic and soluble nuclear proteins (detergent-soluble fraction) and nuclear proteins highly anchored to DNA (DNA-bound fraction). We observed a dose-dependent increase in the DNA-bound HSA_{kin17} protein levels 24 h after γ irradiation starting with a dose of 0.5 Gy (Fig. 2B). No significant induction was noted in the detergent-soluble fraction. Therefore, γ irradiation mainly induced DNA-bound HSA_{kin17} protein. The p53 protein level increased in both fractions, suggesting that γ irradiation induced both DNA-bound p53 as well as detergent-soluble p53 (Fig. 2B). We also noted a slight increase in the PCNA content in the soluble fraction as well as an increase in the insoluble fraction only at 10 Gy. A similar increase in DNA-bound PCNA protein has already been reported at doses higher than 10 Gy (28).

To confirm that IR increased the level of HSA_{kin17} protein

TABLE II
Flow cytometry analysis of cells pulse-labeled with BrdUrd

Cell line	Treatment Gy, 24 h	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
		%	%	%
Control clone	0	64.5 ± 2.1	23.5 ± 2.1	11.5 ± 0.7
Control clone	6	29.0 ± 4.2	6.5 ± 4.9	64.5 ± 9.2
RASK.5	0	44.5 ± 2.1	34.0 ± 1.4	19.5 ± 0.7
RASK.5	6	30.5 ± 0.7	8.0 ± 2.8	60.5 ± 3.5

tightly associated with DNA, the proteins were recovered with buffer N containing increased ionic strengths (0.15, 0.5, or 1 M NaCl), and the amount of *HSAkin17* protein in the detergent-soluble fraction was quantified by ELISA. To quantify the amount of *HSAkin17* protein/cell, we used a two-site immunometric assay (sandwich immunoassay) based on two monoclonal antibodies (24). *HSAkin17* recombinant protein allowed us to calibrate the ELISA (data not shown). The irradiation experiments were performed with RKO cells and with derived clones carrying a pEBVCMV vector (see below). We observed an enhanced recovery of the soluble *HSAkin17* protein with increased ionic strength of buffer N (0.5 or 1 M NaCl) as compared with 0.15 M NaCl (Fig. 2C). Considering that 100% of *HSAkin17* molecules were recovered with 1 M NaCl after irradiation at 6 Gy, we obtained only 73% at 0.5 M NaCl and 35% at 0.15 M NaCl. At 1 M NaCl we reached roughly the same percentage recovery as that obtained with an RIPA buffer. This indicated that increased amounts of *HSAkin17* tightly associated with DNA were observed after damage to DNA (Fig. 2C). At higher ionic strength, the number of *HSAkin17* molecules increased 2.6-fold 24 h after irradiation at 6 Gy (46,000–117,000 molecules). A similar result was obtained with the parental RKO cell lines, implying that the expression of the viral EBNA-1 protein did not interfere with the *HSAkin17* response (data not shown).

Localization of *HSAkin17* Protein in Large Nucleoplasmic Foci Following γ Irradiation—Because several nuclear proteins involved in DNA repair/DNA damage recognition pathways concentrate into nuclear foci after irradiation, we performed immunocytochemical staining using the mAb K36 antibody to determine *HSAkin17* sublocalization in RKO cells. The cells were seeded 3 days before irradiation to avoid serum stimulation of proliferation-associated proteins such as *HSAkin17*. In nonirradiated RKO cells, *HSAkin17* showed a weak and diffuse staining pattern throughout the nucleoplasm (Fig. 3). Twenty-four hours after irradiation, enhanced *HSAkin17* protein levels were clearly detected at 2 and 6 Gy. At these times, *HSAkin17* protein coalesces into large foci that might correspond to the *HSAkin17* fraction tightly associated with DNA.

Isolation of RASK Cells Expressing an Antisense *HSAKIN17* Transcript—To evaluate the importance of foci-forming *HSAkin17* protein during cell proliferation and the cellular response to ionizing radiation, we generated several clones displaying low levels of *HSAkin17* protein.

In a first step, we analyzed endogenous *HSAkin17* protein levels in different human cells by ELISA and Western blot. We conclude that endogenous *HSAkin17* protein is tightly associated with the DNA, whatever the cell line used (data not shown). We also observed that human carcinoma cells, such as RKO cells, exhibited the greatest number of *HSAkin17* molecules/cell as compared with either normal human fibroblasts or other tumoral cells.⁴ For this reason, we decided to reduce the *HSAkin17* protein level in RKO cells. RKO clones were isolated after transfection of the pEBVCMV_{asHSAKIN17} vector (pB399as) carrying a *HSAKIN17* cDNA-SV40 polyadenylation signal cartridge in an antisense orientation, followed by subse-

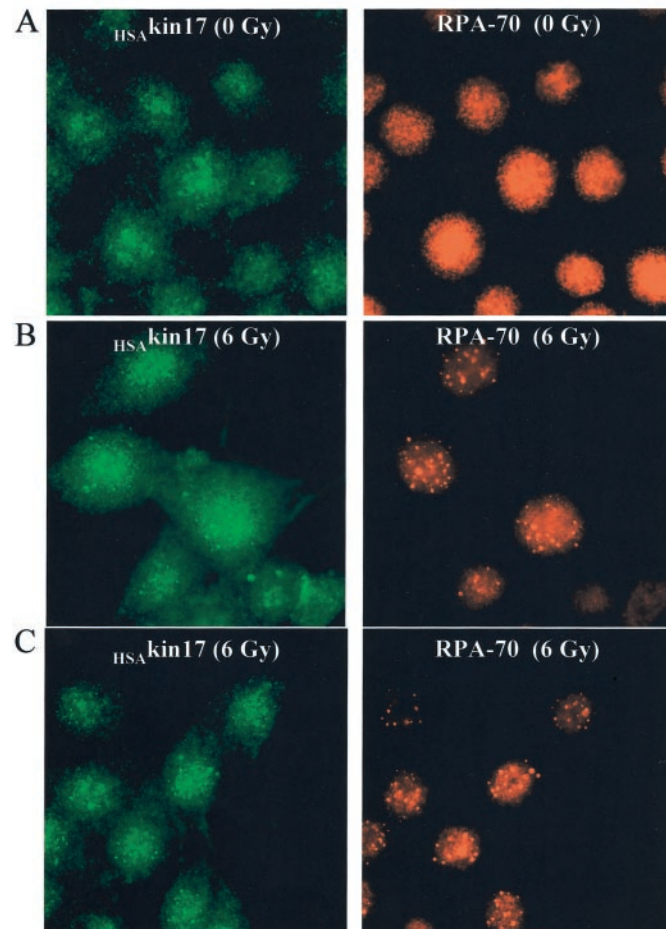


FIG. 6. Co-localization of *HSAkin17* and RPA proteins in response to γ rays. RKO cells were plated 1 day before treatment. Exponentially growing RKO cells untreated (A) or irradiated at 6 Gy for 24 h (B and C). Two representative figures are shown for irradiated cells. Magnification is $\times 500$.

quent hygromycin B selection. These clones were termed RASK (RKO antisense *HSAKIN17*). From the 60 clones isolated, half died rapidly, and the others grew very slowly. After several weeks of cultivation, three RASK clones were selected and characterized in more detail (RASK.1, RASK.5, and RASK.13). Three clones carrying the pEBVCMV vector (pB482) were selected at random and used as controls (R482.1, R482.2, and R482.3).

Because RASK cells expressing the antisense *HSAKIN17* cDNA were usually unstable, we systematically assessed *HSAkin17* protein levels by either immunocytochemical staining or Western blot. As judged by indirect immunofluorescence, more than 95% of *HSAkin17* protein was essentially localized in nucleoplasmic speckles of diameters ranging from 0.1 to 2 μ m in proliferating R482 cells (Fig. 4A). In highly proliferating cells, the greater number of *HSAkin17* foci inside nuclei of R482 cells led to an intense nuclear staining. We further noted that

a few R482 cells presented the staining of an extranuclear structure close to the nuclei (indicated by arrows in Fig. 4A). In the parental RKO cells, we currently detected an extranuclear structure close to the nuclei and probably in the vicinity of the nucleosome, which concentrated the *HSA*kin17-specific fluorescence signal. This indicated that the expression of a viral nuclear protein (EBNA-1) coded by EBV vectors could not account for the observed distribution of the *HSA*kin17 protein. Seven weeks after transfection and hygromycin B selection, the production of antisense *HSA*KIN17 mRNA in RASK cells appeared to decrease strikingly the number of *HSA*kin17 nucleoplasmic foci, leading to a weak diffuse nuclear staining (Fig. 4A). Curiously, RASK cells maintained one or two extranuclear stained structures/cell, suggesting that *HSA*kin17 protein presented here was certainly very stable (arrows in Fig. 4A).

Western blot analysis of *HSA*kin17 protein also revealed a dramatic decrease in the *HSA*kin17 basal level (70–80% less) in the three antisense clones selected, as compared with controls (Fig. 4B). This reduction was specific for *HSA*kin17 protein because the expression of PCNA remained unchanged. Interestingly, RASK cells failed to induce *HSA*kin17 protein 24 h after irradiation, as did control clones. Therefore, we used RASK cells to study the biological consequences of a reduced *HSA*kin17 protein content in a human tumor cell.

Early and Mid-S Phase Accumulation of RASK Cells—We asked whether reduced *HSA*kin17 protein levels affect cell proliferation. Plating efficiencies of the different clones were assessed after seeding the same number of control and RASK cells/cm². Under these culture conditions, RASK cells exhibited a markedly decreased proliferation rate, with plating efficiencies 15-fold lower than those observed for control clones (data not shown). When cells were plated at different densities to account for their specific plating efficiencies, we also observed a dramatic decrease of growing clones in both RASK clones (Table I). Therefore, decreased levels of *HSA*kin17 protein strongly affected cell growth.

This decreased cell proliferation observed in RASK cells that express the antisense *HSA*KIN17 mRNA could stem from alteration of their cell cycle. Therefore, we analyzed the cell cycle of BrdUrd pulse-labeled RASK clones by flow cytometry analysis. The cells were seeded 3 days before irradiation (6 Gy) and analyzed 24 h later. The cells were pulse-labeled for 15 min with 30 μ M BrdUrd. Incorporation of BrdUrd into cellular DNA was measured by fluorescence-activated cell sorter analysis, and the percentage of BrdUrd-positive cells corresponded to S phase cells actively synthesizing DNA (Fig. 5).

Comparison of the cell cycle of RASK cells versus control cells revealed a low number of RASK.5 cells in the G₁ phase (45 \pm 2%) as compared with control (65 \pm 2%) and an enhanced proportion of BrdUrd-positive cells with a DNA content between 2 and 4 N (34 \pm 1% versus 24 \pm 2%) (Fig. 5 and Table II). RASK.5 cells accumulated in early and mid-S phase, but only a few cells were detected in late S phase (Fig. 5C). This suggested that low *HSA*kin17 protein levels resulted in better entry into the S phase, but replicating cells were hampered in their progress to the S phase. We also detected an elevated percentage of cells in the G₂ phase (20 \pm 1%) as compared with control cells (12 \pm 1%). We obtained similar results using RASK.13 cells (data not shown). These cell cycle modifications could explain the reduced proliferation rates observed in the RASK cells. R482.1 cells and RASK.5 cells displayed a G₂ arrest 24 h after 6 Gy, with 65 \pm 9% and 61 \pm 4% of cells in G₂ phase, respectively, indicating that *HSA*kin17 protein is not essential for the γ -ray-induced G₂ arrest (Fig. 5, F versus H).

Endogenous *HSA*kin17 Co-localized with the RPA Protein 24 h after Irradiation—Because *HSA*kin17 is (i) associated with DNA and (ii) induced after IR at later times post-irradiation (24 h), we hypothesized that after irradiation *HSA*kin17 protein could be associated with remaining DNA lesions. This prompted us to compare the intracellular localization of *HSA*kin17 with a protein known to participate in the DNA repair processes.

In mock-irradiated proliferating RKO cells, RPA was uniformly distributed throughout the nucleoplasm as a dispersed and punctate pattern that corresponds to replication foci (Fig. 6A). After γ irradiation, RPA concentrated in nuclear foci of very strong intensity and almost all the bright RPA foci co-localized with *HSA*kin17 (Fig. 6, B and C). These results suggested that *HSA*kin17 and RPA could cooperate in response to IR-induced DNA lesions. However, RPA and *HSA*kin17 foci of strong intensity were never detected soon after irradiation at 6 Gy (3 h and 6 h) in proliferating RKO cells nor at later times post-irradiation in slowly proliferating RKO cells (data not shown). Co-immunoprecipitation experiments were unsuccessful in demonstrating a strong physical interaction between endogenous *HSA*kin17 and RPA-70 proteins in RKO cells. We assumed that (i) *HSA*kin17 and RPA belong to a same high molecular weight complex without direct interaction between them, (ii) only a small fraction of both proteins participate in the same nuclear foci, and (iii) constitutive amounts of both *HSA*kin17 and RPA proteins were too low to be detected under our experimental conditions.

DISCUSSION

The well conserved kin17 proteins are DNA-binding proteins activated in response to ionizing and UVC irradiations (19, 20). Prior studies were mainly performed at the mRNA level. Recently, the production of large amounts of human recombinant *HSA*kin17 protein made it possible to obtain a panel of new monoclonal antibodies and to develop biochemical approaches. This also affords us the opportunity to quantify endogenous *HSA*kin17 protein levels in different human cells using ELISA. Normal, immortalized, or tumoral cells present a wide range of *HSA*kin17 protein levels. Although proliferating normal human fibroblasts elicited a low level, non-small cell lung carcinoma cells (H1299) and colorectal carcinoma cells (RKO) display the highest level.⁵ Therefore, high *HSA*kin17 protein levels are observed during carcinogenesis that may be a consequence of uncontrolled proliferation or genomic instability. Alternatively, elevated levels could be required during the process of cancer development. Immunocytochemical staining performed with the mAb K36 antibody identified *HSA*kin17 as a protein mainly localized in nuclei with a staining pattern resembling those observed for other proteins involved in DNA replication. This observation is consistent with the previously reported localization of kin17 protein in HeLa cells using antibodies directed against the mouse *MMU*kin17 protein and raised in rabbits (12). Interestingly, certain tumor-derived cells concentrate a part of the *HSA*kin17 protein in a dense fluorescence focus neighboring to the nucleus, particularly in resting cells. At present, we have no explanation for this observation.

We identify here *HSA*kin17 as a protein tightly associated *in vivo* with the chromosomal DNA. We show that *HSA*kin17 protein exists in the cells as both a soluble fraction and a DNA-bound fraction. Other nuclear proteins involved in the DNA metabolism, such as PCNA, exhibited a similar distribution. IR triggers a redistribution of *HSA*kin17 protein from a soluble form to DNA-bound complexes comparable with that observed

for PCNA (28). However, whereas an increased level of the PCNA insoluble fraction was observed at higher doses of irradiation (e.g. 10 Gy in our experiment), the DNA-bound *HSA*kin17 fraction increases at a lower dose (0.5 Gy). This enhanced amount of *HSA*kin17 bound to DNA observed after irradiation coincides with the appearance of large intranuclear foci of *HSA*kin17 scattered throughout the nucleus. We show that *HSA*kin17 and RPA proteins co-localized in large foci 24 h after irradiation at 6 Gy. IR-induced RPA/*HSA*kin17 foci were observed only in highly proliferating cells, suggesting that DNA replication is required.

The heterotrimeric RPA protein is a single-stranded DNA-binding protein required for DNA replication, recombination, nucleotide excision repair, DSB repair, and transcriptional regulation (29). RPA is a crucial component of the early stage of nucleotide excision repair, because it binds synergistically with XPA to damaged single-strand DNA, allowing the subsequent recruitment of the other repair factors at the site of DNA damage (30, 31). RPA is also involved in the gap-filling step of nucleotide excision repair, which requires PCNA, RF-C, and DNA polymerase δ/ϵ (32). RPA forms discrete foci after irradiation in many cell lines. The rate of dispersion of foci-forming proteins is usually compared with the rate of DSB repair. Kinetic experiments of DSB repair have previously shown a biphasic response with a fast component for repair of most breaks (half-time ranging from 20 to 30 min) followed by a slow component for repair of the remaining breaks (90–300 min) (33). MacPhail and Olive (34) have shown that the extent of IR-induced RPA foci increased linearly between 8 and 24 h of incubation after irradiation, suggesting that RPA foci concentrated after the completion of DNA repair at sites of unreparable DNA damage. Golub *et al.* (35) have demonstrated that RPA co-localized with the DNA recombinational protein Rad51 through its 70-kDa subunit. The highest number of Rad51-RPA co-localizations was observed 1 day following irradiation (5 Gy) of mouse fibroblasts. Furthermore, 30 h after irradiation RPA co-localizes with Rad51 in micronuclei (36). Taken together these data indicate that RPA foci are associated with unrepaired DNA damage and/or with DNA sites that are unable to replicate. The idea that a fraction of *HSA*kin17 protein co-localized with RPA foci at these sites of damaged DNA is further supported by the observation that *HSA*kin17 protein co-purifies with proteins of the replication complex of human cells.⁵

If *HSA*kin17 protein acts at the site of DNA replication, in particular of damaged DNA, a lowered *HSA*kin17 protein level might impede cell proliferation and decrease resistance to IR. The antisense strategy used here to constitutively decrease the *HSA*kin17 protein level confirmed this idea. The overexpression of an antisense *HSA*KIN17 transcript led to a 75% decrease in the *HSA*kin17 protein level, which correlates with a reduced cell growth and increased radiosensitivity.⁶ Flow cytometry analysis of BrdUrd incorporation showed an accumulation of *HSA*kin17 antisense cells in early and mid-S phase and a subsequent increase in the number of cells in the G₂ phase. The increased number of cells in the G₂ phase may correspond to RASK cells undergoing DNA repair. We hypothesized that a premature entry of RASK cells into the S phase, as evidenced by the low number of cells in the G₁ phase, may lead to an accumulation of DNA damage and a subsequent arrest in the G₂ phase. The accumulation of

RASK cells in early and mid-S phase indicates that *HSA*kin17 protein participates in DNA replication. Indeed, ongoing experiments revealed that *HSA*kin17 protein co-purifies with RPA and PCNA proteins in elution fractions corresponding to DNA replication complexes.⁵

Our results show that human PCNA and *HSA*kin17 proteins are components of the same set of replication proteins activated by ionizing radiation. The decrease in the intracellular concentration of *HSA*kin17 protein affects the cell cycle, apparently by interfering with proteins localized at damaged DNA sites unable to replicate. The RASK cells described here compared with other human cells unable to repair double-strand breaks will be used to test this idea further and to shed some light on the molecular role played by the human *HSA*kin17 protein.

Acknowledgments—We are indebted to J. Grassi for advice and support and to M. Plaisance, P. Lamourette, and M. C. Nevers for efficient help in producing monoclonal antibodies and setting up the ELISA. We are grateful to D. Rouillard (Institut Curie) for having kindly performed the flow cytometry analysis of BrdUrd-labeled cells. D. Biard is grateful to M. F. Poupon and E. May for cell lines and antibodies.

REFERENCES

- Dasika, G. K., Lin, S.-C. J., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A., and Lee, E. Y.-H. P. (1999) *Oncogene* **18**, 7883–7899
- Rothkamm, K., Kuhne, M., Jeggo, P. A., and Lobrich, M. (2001) *Cancer Res.* **61**, 3886–3893
- Liang, F., Han, M., Romanienko, P. J., and Jasin, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5172–5177
- Maser, R. S., Monsen, K. J., Nelms, B. E., and Petrini, J. H. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6087–6096
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000) *Curr. Biol.* **10**, 886–895
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W. M. (1999) *J. Cell Biol.* **146**, 905–916
- Schultz, L. B., Chehab, N. H., Malikzay, A., and Halazonetis, T. D. (2000) *J. Cell Biol.* **151**, 1381–1390
- Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., and Jun Qin, J. (2000) *Genes Dev.* **14**, 927–939
- Zhong, Q., Chen, C.-F., Shang Li, S., Chen, Y., Wang, C.-C., Xiao, J., Chen, P.-L., Sharp, D. Z., and Lee, W.-H. (1999) *Science*, **285**, 747–750
- Angulo, J. F., Moreau, P. L., Maunoury, R., Laporte, J., Hill, A. M., Bertolotti, R., and Devoret, R. (1989) *Mutat. Res.* **217**, 123–134
- Angulo, J. F., Rouer, E., Mazin, A., Mattei, M. C., Tissier, A., Horellou, P., Benarous, R., and Devoret, R. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 5117–5123
- Kannouche, P., Mauffrey, P., Pinon-Lataillade, G., Mattei, M. G., Sarasin, A., Daya-Grosjean, L., and Angulo, J. F. (2000) *Carcinogenesis* **21**, 1701–1710
- Kurumizaka, H., Aihara, H., Ikawa, S., Kashima, T., Bazemore, L. R., Kawasaki, K., Sarai, A., Radding, C. M., and Shibata T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 33515–33524
- Mermel, N., Angulo, J., Reperant, J., Medina, M., and Araneda, S. (1998) *Neurosci. Lett.* **243**, 97–100
- Araneda, S., Mermel, N., Verjat, T., Angulo, J. F., and Radicella, J. P. (2001) *Brain Res. Bull.* **56**, 139–146
- Mazin, A., Milot, E., Devoret, R., and Chartrand, P. (1994) *Mol. Gen. Genet.* **244**, 435–438
- Mazin, A., Timchenko, T., Mènisier-de Murcia, J., Schreiber, V., Angulo, J. F., de Murcia, G., and Devoret, R. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4335–4341
- Timchenko, T., Bailone, A., and Devoret, R. (1996) *EMBO J.* **15**, 3986–3992
- Biard, D. S. F., Saintigny, Y., Maratrat, M., Paris, F., Martin, M., Angulo, J. F. (1997) *Radiat. Res.* **147**, 442–450
- Kannouche, P., Pinon-Lataillade, G., Tissier, A., Chevalier-Lagente, O., Sarasin, A., Mezzina, M., and Angulo, J. F. (1998) *Carcinogenesis* **19**, 781–789
- Blattner, C., Kannouche, P., Litfin, M., Bender, K., Rahmsdorf, H. J., Angulo, J. F., and Herrlich, P. (2000) *Cell Biol.* **20**, 3616–3625
- Biard, D. S. F., Saintigny, Y., Maratrat, M., Vozenin, M. C., Martin, M., Daburon, F., and Angulo, J. (1997) *Arch. Dermatol. Res.* **289**, 448–456
- Biard, D. S. F., Kannouche, P., Lannuzel-Drogou, C., Mauffrey, P., Apiou, F., and Angulo, J. F. (1999) *Exp. Cell Res.* **250**, 499–509
- Grassi, J., Frobert, Y., Pradelles, P., Cherucitte, F., Gruaz, D., Dayer, J. Y., and Poubelle, P. (1989) *J. Immunol. Methods* **123**, 193–210
- Göhring, F., and Fackelmayer, O. (1997) *Biochemistry* **36**, 8276–8283
- Bensaad, K., Rouillard, D., and Soussi, T. (2001) *Oncogene* **20**, 3766–3775
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998) *Science* **282**, 1497–1501
- Balajee, A. S., and Geard, C. R. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 1341–1351
- Oakley, G. G., Loberg, L. I., Yao, J., Risinger, M. A., Yunker, R. L., Zernik-Kobak, M., Khanna, K. K., Lavin, M. F., Carty, M. P., and Dixon, K. (2001)

⁵ L. Miccoli, D. S. F. Biard, and A. J. F. Angulo, manuscript in preparation.

⁶ E. Despras, L. Niccoli, C. Créminon, J. F. Angulo, and D. S. F. Biard, submitted for publication.

- Mol. Cell. Biol.* **12**, 1199–1213
30. Schweizer, U., Hey, T., Lipps, G., and Krauss, G. (1999) *Nucleic Acids Res.* **27**, 3183–3189
31. Wang, M., Mahrenholz, A., and Lee, S.-H. (2000) **39**, 6433–6439
32. Li, L., Peterson, C. A., Zhang, X., and Legerski, R. J. (2000) *Nucleic Acids Res.* **28**, 1424–1427
33. Nunez, M. I., Villalobos, M., Olea, N., Valenzuela, M. T., Pedraza, V., McMillan, T. J., and Ruiz de Almodovar, J. M. (1995) *Br. J. Cancer* **71**, 311–316
34. MacPhail, S. H., and Olive, P. L. (2001) *Radiat. Res.* **155**, 672–679
35. Golub, E. I., Gupta, R. C., Haaf, T., Wold, M. S., and Radding, C. M. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 5388–5393
36. Haaf, T., Raderschall, E., Reddy, G., Ward, D. C., Radding, C. M., and Golub, E. I. (2001) *J. Cell Biol.* **144**, 11–20

Article II

Article II

La déplétion de kin17, une protéine humaine de la replication de l'ADN, augmente la radiosensibilité dans les cellules RKO. E. Despras, L. Miccoli, C.

Créminon, D. Rouillard, J.F. Angulo and D.S.F. Biard. Radiat. Res 159, 748–758. 2003.

Nous avons étendu les résultats obtenus après irradiation γ de cellules de la lignée RKO à d'autres types cellulaires et à un autre agent génotoxique, l'étoposide (VP16). De plus, nous avons utilisé les cellules RASK pour analyser les conséquences d'une réduction du niveau d'expression de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ sur la survie cellulaire après RI.

1. Le niveau d'expression de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ varie selon la lignée tumorale analysée.

Certaines lignées tumorales sur-expriment la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$. Parmi les 16 lignées analysées, le niveau le plus élevé de protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ est observé dans la lignée H1299 (cancer du poumon à grosses cellules) et le plus faible dans la lignée MeWo (mélanome). Cependant, aucune corrélation n'a pu être établie entre le niveau intrinsèque de protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ et la radiosensibilité. Les cellules présentant un niveau élevé de protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ présentent également un niveau élevé de protéine RPA70 (sous-unité de 70 kDa de RPA). Un niveau d'expression important de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ pourrait être une conséquence du phénotype tumoral ou un pré-requis à son établissement.

2. La fraction de la protéine $HSAkin17$ associée à la chromatine augmente aux temps tardifs après induction de cassures double-brin de l'ADN.

La quantité de protéines $HSAkin17$ et RPA70 augmentent dans la fraction protéique associée à la chromatine 24 h après irradiation γ dans trois lignées présentant des niveaux différents de protéine $HSAkin17$ (HCT116, RKO et H1299). Ce résultat étend à d'autres types cellulaires les résultats présentés dans l'article I. Le traitement par le VP16, un inhibiteur de la topoisomérase II générant des DSB, entraîne également une augmentation de la protéine $HSAkin17$ dans la fraction protéique associée à la chromatine et la concentration de la protéine $HSAkin17$ dans des foyers intra-nucléaires. La protéine $HSAkin17$ pourrait être associée à des sites endommagés de l'ADN, en particulier au niveau de DSB résiduelles.

3. La sur-expression de la protéine $HSAkin17$ entraînerait des modifications structurelles de la chromatine.

L'analyse par cytométrie en flux de cellules sur-exprimant de façon transitoire et exogène la protéine $HSAkin17$ (lignées RKO et H1299) révèle une altération de l'intercalation de l'iodure de propidium dans l'ADN. Ainsi, la sur-expression de la protéine $HSAkin17$ pourrait induire des changements dans la conformation de la chromatine. Cette hypothèse concorde avec le fait qu'une fraction de la protéine $HSAkin17$ endogène est associée à la chromatine (Article I). De plus, cela pourrait expliquer les altérations nucléaires observées dans les cellules sur-exprimant la protéine $HSAkin17$ de façon exogène (Biard et al., 1999; Kannouche and Angulo, 1999).

4. La déplétion de la protéine $HSAkin17$ dans la lignée RKO entraîne une augmentation de la radiosensibilité.

Les cellules RASK ont été obtenues par transfection stable d'un vecteur portant l'ADNc du gène $HSAKIN17$ en position « antisens » dans des cellules RKO. Elles présentent un niveau réduit de protéine $HSAkin17$ correspondant à 25% du contrôle (Article I). Les cellules RASK sont 6 fois plus sensibles que les cellules contrôle à 2 Gy.

Hypothèse :

Les DSB sont les dommages les plus délétères créés par les RI. Les résultats présentés dans l'Article II indiquent que la protéine $HSAkin17$ pourrait participer à la réponse cellulaire aux DSB, un déficit en protéine $HSAkin17$ entraînant une radiosensibilité accrue.

Depletion of KIN17, a Human DNA Replication Protein, Increases the Radiosensitivity of RKO Cells

E. Despras,^a L. Miccoli,^a C. Créminon,^b D. Rouillard,^c J. F. Angulo^a and D. S. F. Biard^{a,1}

^a CEA, Commissariat à l’Energie Atomique, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, Département de Radiobiologie et de Radiopathologie, Direction des Sciences du Vivant, Fontenay-aux-Roses 92265, France; ^b CEA, Commissariat à l’Energie Atomique, Service de Pharmacologie et d’Immunologie, Département de Recherche Médicale, Direction des Sciences du Vivant, CE Saclay, Gif sur Yvette 91191, France; and ^c INSERM U509, Laboratoire de Pathologie Moléculaire des Cancers, Institut Curie, 26 rue d’Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

Despras, E., Miccoli, L., Créminon, C., Rouillard, D., Angulo, J. F. and Biard, D. S. F. Depletion of KIN17, a Human DNA Replication Protein, Increases the Radiosensitivity of RKO Cells. *Radiat. Res.* 159, 748–758 (2003).

The human KIN17 protein is a chromatin-associated protein involved in DNA replication. Certain tumor cell lines overproduce KIN17 protein. Among 16 cell lines, the highest KIN17 protein level was observed in H1299 non-small cell lung cancer cells, whereas the lowest was detected in MeWo melanoma cells. Cells displaying higher KIN17 protein levels exhibited elevated RPA70 protein contents. High KIN17 protein levels may be a consequence of the tumorigenic phenotype or a prerequisite for tumor progression. Twenty-four hours after exposure to ionizing radiation, after the completion of DNA repair, a co-induction of chromatin-bound KIN17 and RPA70 proteins was detected. Etoposide, an inhibitor of topoisomerase II generating double-strand breaks, triggered the concentration of KIN17 into punctuate intranuclear foci. KIN17 may be associated with unrepaired DNA sites. Flow cytometry analysis revealed that 48 h after transfection the uppermost KIN17-positive RKO cells shifted in the cell cycle toward higher DNA content, suggesting that KIN17 protein induced defects in chromatin conformation. Cells displaying reduced levels of *KIN17* transcript exhibited a sixfold increased radiosensitivity at 2 Gy. The KIN17 protein may be a component of the DNA replication machinery that participates in the cellular response to unrepaired DSBs, and an impaired KIN17 pathway leads to an increased sensitivity to ionizing radiation. © 2003 by Radiation Research Society

INTRODUCTION

Among eukaryotes, the phylogenic conservation of *KIN17* genes is remarkable and points to an essential role for these genes. Indeed, *KIN17* orthologue genes have been identified in numerous organisms such as humans, mice, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Brugia*

malayi and *Schizosaccharomyces pombe* (J. Angulo, manuscript in preparation). In human cells, only one *KIN17* gene and protein have been identified in the different cell lines tested. KIN17 proteins are nuclear zinc-finger proteins that cross-react with antibodies raised against the RecA protein, a key enzyme involved in homologous recombination and recombinational repair in *E. coli* (1). However, KIN17 proteins are not RecA homologues, because the sequence homology is confined to a 39-amino acid domain stretching over the C-terminus of the RecA protein (2). The mouse Kin17 protein, which is 92% identical to its human counterpart, preferentially binds *in vitro* to double-stranded DNA with a curved topology such as that encountered in illegitimate recombination junctions (3, 4). A role in the control of gene transcription has been proposed based on the fact that mouse Kin17 protein was able to substitute the histone-like nucleoid-structuring (H-NS) transcription factor in deficient bacteria and either trigger or repress transcription of genes belonging to the *bgl* operon (5). Interestingly, both mouse Kin17 and H-NS proteins bound preferentially to curved DNA encompassing the *bgl* promoter. Moreover, the transient expression of mouse Kin17 protein arrests cell proliferation of human tumor cells in culture (6, 7).

The human *KIN17* gene is located on chromosome 10 at position p15-p14, and it presents an expression profile similar to that of housekeeping genes. *KIN17* transcripts were found in all human tissues tested. Heart, skeletal muscle and testis displayed the highest *KIN17* mRNA levels (8). The human KIN17 protein is an *in vivo* DNA-binding protein that is directly associated with chromosomal DNA as judged by crosslinking experiments on living human cells (9). We have demonstrated that human KIN17 protein is involved in SV40 DNA replication (10). KIN17 protein directly interacts with SV40 large T antigen through amino acids 168 to 383 located in the N-terminal portion of T antigen. These amino acids form part of a major domain of the T antigen responsible for DNA binding and for the interaction with TP53 and DNA polymerase α protein. The functional interaction between KIN17 protein and T antigen

¹ Address for correspondence: CEA-DSV-DRR, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, BP 6, 92265 Fontenay aux Roses, France; e-mail: biard@dsvidf.cea.fr.

takes place in a nuclear multiprotein complex of high molecular weight (10). Interestingly, the binding of KIN17 protein was greater when T antigen was already bound to its own SV40 core origin, which contains curved DNA sequences. High amounts of KIN17 protein may inhibit T antigen-dependent DNA replication through a direct interaction with T antigen instead of through a general poisoning mechanism due to the binding to curved DNA. The involvement of KIN17 protein in DNA replication has also been emphasized by analysis of cells pulse-labeled with BrdU that exhibit a *KIN17* antisense transcript (RASK cells). The overexpression of a *KIN17* antisense transcript led to a 75% decrease in the KIN17 protein level and entailed major growth disadvantages. We have observed a premature entry of RASK cells into S phase, as seen by the low number of cells in G₁ phase, which may lead to an accumulation of DNA damage and a subsequent arrest in G₂ phase (9). Interestingly, RASK cells accumulated in early and mid S phase, suggesting that KIN17 protein participates in DNA replication.

Another aspect of mouse and human KIN17 proteins is that these proteins are activated by stresses such as ultraviolet C (UVC) or ionizing radiation (9, 11–13). Gamma rays induce an accumulation of chromatin-bound KIN17 24 h after irradiation (9). At this time, KIN17 concentrates into large nuclear foci with RPA70 (replication protein A, 70-kDa subunit). RPA is a multifunctional protein that participates in both DNA replication and various types of DNA repair including DSB repair (14). The concentration of the RPA protein after the completion of DNA repair suggests that RPA is associated with damaged DNA sites (15). These data indicate that both RPA and KIN17 foci could be associated with remaining unrepaired DNA damage and/or with DNA sites that are unable to replicate. A link between DNA damage and the Kin17 pathway was highlighted by Blattner *et al.* (16), who demonstrated that UVC-radiation-induced DNA damage was required for the stabilization of *Kin17* mRNA in mouse fibroblasts. In particular, it was observed that Δ XPA mouse cells, which are unable to repair DNA damage induced by UVC radiation, accumulated *Kin17* mRNA at lower doses of radiation than repair-proficient mouse fibroblasts. Recently, we used different DNA repair-proficient and -deficient human cells (e.g. Xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome) to show that global genome repair was required to activate the expression of the *KIN17* gene after UVC irradiation. The presence of both functional XPA and XPC proteins was a prerequisite for the up-regulation of *KIN17* gene expression after UVC irradiation (13). This observation points out a direct correlation between UV-radiation-induced DNA damage and *KIN17* gene regulation.

Herein, we demonstrate for the first time that KIN17 protein is expressed in several tumor-derived cells with a wide range of expression. While H1299 non-small cell lung cancer cells, K562 chronic myelogenous leukemia cells, and immortalized HEK 293 embryonic kidney cells overpro-

duced KIN17 protein, MeWo melanoma cells displayed very low KIN17 protein levels. In all cell lines, KIN17 protein is tightly associated with the chromatin structure. Interestingly, our results showed a relationship between KIN17 and RPA70 protein expression. We found that like ionizing radiation, etoposide, a drug known to inhibit DNA synthesis and to provoke DNA DSB formation, induced an accumulation of chromatin-bound KIN17 protein as well as a concentration of the KIN17 protein in large intranuclear foci. The requirement for KIN17 protein in the response to DNA-damaging agents was reinforced by the increased radiosensitivity of RKO cells, which displayed a fourfold reduction in KIN17 protein levels. We also showed that KIN17-overexpressing RKO and H1299 cells exhibited a change in propidium iodide (PI) accessibility as shown by flow cytometry analysis. This observation suggests that overproduction of KIN17 could temporally change chromatin conformation. Collectively, our observations support the hypothesis that KIN17 protein is a component of the DNA replication machinery that plays an essential role in the response to unrepaired DSBs and to the resistance to radiation.

MATERIALS AND METHODS

Cell Cultures

LoVo, HT29, HCT 116 and RKO cells (colorectal carcinoma), H1299 and A549 cells (non-small cell lung cancer), K562 cells (chronic myelogenous leukemia), HL-60 (acute promyelocytic leukemia), PC3 (prostatic carcinoma), HeLa cells (cervical carcinoma), SHEP cells (neuroblastoma), HEK 293 cells (embryonic kidney cells transformed with adenovirus 5 DNA fragments), MCF7 cells (adenocarcinoma; mammary gland; breast), MeWo cells (melanoma), KHOS 240S cells (osteosarcoma), HaCaT cells (immortalized epidermal keratinocytes), and BCPAP cells (thyroid carcinoma) were maintained in a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/ml of penicillin and 100 μ g/ml of streptomycin under 95% air/5% CO₂. Cloning of EBV vectors carrying *KIN17* cDNA in either a sense or anti-sense orientation and transfection experiments were described elsewhere (6). Clones derived from the RKO cells and carrying a *KIN17* antisense construct were termed RASK (for RKO antisense KIN17) clones 1, 5 or 13, and control clones were named R482 (9).

Clonogenic cell growth after transfection was performed as described previously (6). Hygromycin B selection was performed as followed: 125 μ g/ml for HEK 293 and HCT 116 cells, 250 μ g/ml for H1299 cells, and 500 μ g/ml for RKO cells. Each point represents the mean of three culture dishes. Experiments were performed three times with HCT 116 cells and more than five times with other cells. Colony formation was normalized as a percentage of the control pEBVCMVEGFP.

Cells were irradiated using a ¹³⁷Cs γ -ray source (IBL 637 CisBio International) at a dose rate of 1.97 Gy/min. For clonogenic cell survival after irradiation, 10 control cells (RKO, R482.1), 33 RASK.5 cells and 100 RASK.13 cells were seeded per cm² to account for their different plating efficiencies. Cells were irradiated 1 day later and cultured for 2 weeks in the presence of hygromycin B. Growing clones were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with methylene blue, and clones containing more than 50 cells were counted. Each experiment was performed in triplicate.

Antibodies against KIN17 Protein

Monoclonal antibodies (K3, K31, K36, K58) were obtained after inoculation of recombinant His-tagged human KIN17 protein ([His]₆-KIN17) purified by metal chelation and heparin column from baculovirus-infected Sf9 *Spodoptera frugiperda* cell extracts and injected in mice as described previously. We used immunoglobulin G (IgG) anti-KIN17 (IgG K36 and K58) purified from ascitic fluid (9).

Indirect Immunofluorescence Staining

Cells were plated at 5,000 cells per cm² on glass cover slips and treated. At the indicated times after treatment, cells were fixed either in 70% acetone/30% methanol (5 min at -20°C) or in 4% paraformaldehyde (20 min at room temperature) and permeabilized with 0.5% Triton X-100 and 0.5 mM CuSO₄ (10 min at room temperature). Cells were stained for 45 min with the purified IgG K36 anti-KIN17 (400 ng/ml) diluted in the buffer B (0.5% Tween 20, 12% BSA, 0.036% NaN₃ in PBS). Primary antibodies were revealed with Cy3[™]-conjugated affinity purified goat anti-mouse IgG (Jackson Laboratory; 2 µg/ml in buffer B). Cells were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; 4 µg/ml). Immunofluorescence staining was viewed using a Zeiss Axiophot 2 epifluorescence microscope coupled to a cooled Sensys 1400 camera from Photometrics monitored by the Zeiss KS300 3.0 program. Treatment experiments were reproduced more than ten times under different culture conditions.

Protein Extraction, Western Blotting and ELISA

To discriminate between nuclear proteins highly anchored to DNA and cytoplasmic proteins and soluble nuclear proteins, 0.5 × 10⁶ cells of each tumor-derived cell line were seeded in 10-cm dishes 3 days before trypsinization. Cells were lysed with 100 µl per 10⁶ cells of hypotonic buffer A as indicated elsewhere (10). For ELISA, the anchored nuclear protein fraction was resuspended in RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Igepal[™], 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate, protease inhibitor cocktail (complete from Roche)].

Twenty-four hours after irradiation or etoposide treatment, cells were trypsinized, counted and washed in PBS. For the analysis of total protein content, cells were directly lysed with 100 µl per 10⁶ cells of 2× Laemmli buffer. To discriminate between the chromatin-bound fraction and the detergent-soluble fraction, cells were lysed with 100 µl per 10⁶ cells of buffer N [50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 150 mM NaCl, 1% Igepal[™], 1 mM EDTA, protease inhibitor cocktail (complete from Roche)]. Lysates were maintained on ice for 30 min. Soluble proteins were recovered after centrifugation (20,000g for 15 min). Remaining pellets (insoluble proteins) were denatured directly with 100 µl per 10⁶ cells of 2× Laemmli buffer.

Proteins were analyzed by Western blotting or ELISA as described previously (9). For Western blotting, purified IgG K36 and K58 were used at the concentration of 40 ng/ml. Other antibodies used were anti-TP53 protein (mAb DO-7 diluted to 1/2,000; kindly provided by E. May), anti-PCNA (mouse monoclonal PC10 antibody diluted to 50 pg/ml; Novo Castra), anti-RPA70 (50 pg/ml; Oncogene Research products NA13), anti-p34^{cdc2} (100 pg/ml; Santa Cruz sc-54).

Flow Cytometry Analysis

For flow cytometry analysis of KIN17 protein and DNA, RKO and H1299 cells were plated at a density of 5,000 cells per cm² in 6-cm culture dishes 3 days before transfection. Cells were transfected with 2 µg of DNA and 6 µl of LipofectAMINE 2000 (Gibco BRL). Forty-eight hours later, cells were collected by trypsinization, washed with PBS, and fixed in 75% ethanol at 4°C for at least 24 h. Cells were washed twice in PBS and incubated for 45 min at room temperature with either 4 µg per sample of purified IgG K36 (against KIN17 protein) or purified IgG anti-His (negative control) diluted in buffer B. Cells were washed twice in PBS and incubated for 45 min at room temperature with 0.6 µg per sample of Cy2[™]-conjugated antibody in buffer B. Cells were washed

twice in PBS and the nuclear DNA was stained with PI (Sigma; 4 µg/ml) in the presence of RNase (Sigma; 10 µg/ml) in PBS for at least 30 min. Stained cells were analyzed on a FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) using CellQuest software. A total of 20,000 cells gated as single cells using FL2A/FL2W scatter were analyzed. Each experiment was performed at least three times.

Flow cytometry analysis of BrdU incorporation was as described (9).

RESULTS

Overproduction of KIN17 Protein in Certain Tumor Cell Lines

It has been reported that KIN17 mRNA is ubiquitously expressed in all mouse and human tissues tested. We asked whether this reflected the levels of endogenous KIN17 protein in cultured human cells. We used a hypotonic buffer containing 0.1% Triton X-100 to discriminate between nuclear proteins highly anchored to DNA and cytoplasmic and soluble nuclear proteins. Cells were seeded 3 days before recovery to minimize serum stimulation. Nuclear proteins highly anchored to DNA were resuspended in a RIPA buffer and quantified by an ELISA. KIN17 ELISA was optimized by using recombinant histidine-tagged KIN17 protein. Among all the monoclonal antibodies tested, K3 and K31 were chosen, the K3 being conjugated to acetylcholinesterase as reporter enzyme. We ruled out the possibility of a loading artifact because similar results were obtained when data were expressed as the number of KIN17 molecules per cell or as the picograms of KIN17 per microgram of total proteins (Fig. 1A). Our results revealed a wide range of KIN17 protein expression. While H1299 non-small cell lung cancer cells, K562 chronic myelogenous leukemia cells, and immortalized HEK 293 embryonic kidney cells exhibited elevated KIN17 basal protein levels, MeWo melanoma cells displayed very low KIN17 protein levels.

To confirm these data, the same samples were analyzed by Western blotting. We observed that all cell lines (1) expressed a band of about 45 kDa corresponding to the whole KIN17 protein and (2) displayed higher KIN17 protein levels in the insoluble fraction corresponding to the proteins anchored to chromatin structures (Fig. 1B). We confirmed that H1299, K562 and HEK 293 cells overexpressed endogenous KIN17 protein. However, under these conditions we obtained slight variations compared to ELISA. For instance, KHOS 240S cells displayed a low KIN17 protein content in ELISA (using mAb K3 and K31) relative Western blotting where they exhibited elevated KIN17 protein content (using mAb K36 and K58). This could be due to post-translational modifications of the KIN17 protein that modified antibody recognition. We also assessed the PCNA protein content because this protein is deeply involved in DNA metabolism. The PCNA protein was slightly associated with the chromatin structure and therefore was recovered mainly in the soluble fraction, as observed previously (9, 10). This result emphasized that the association of KIN17 protein with chromatin structures was stronger than that of PCNA.

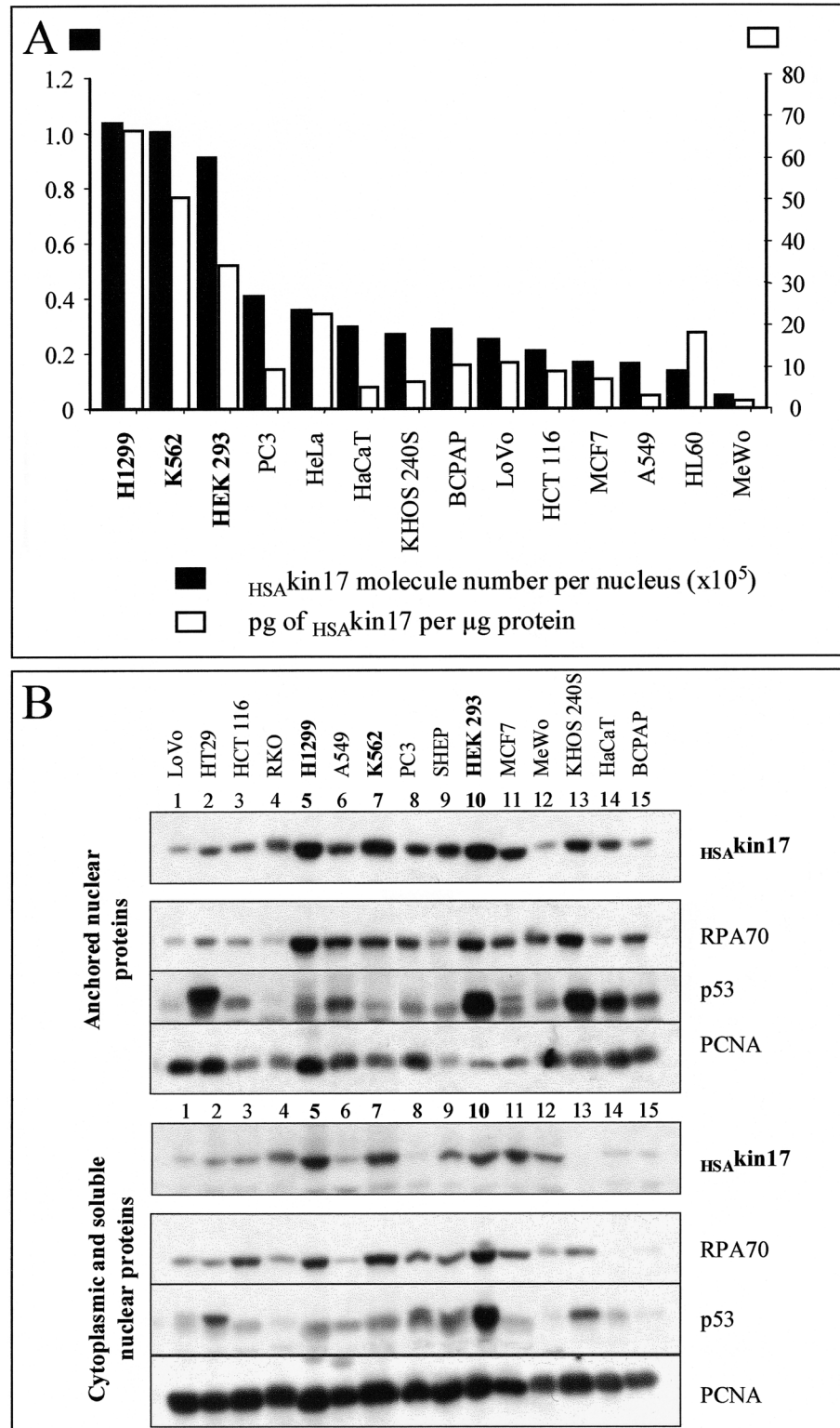


FIG. 1. Certain carcinoma cell lines overproduce the endogenous KIN17 protein (HSA^{kin17}). A total of 0.5×10^6 cells were seeded in 10-cm dishes 3 days before trypsinization. 5×10^6 cells of each cell line were lysed in buffer A for exactly 3 min on ice as described in the Materials and Methods. Nuclear proteins anchored to DNA and cytoplasmic proteins and soluble nuclear proteins were recovered separately. Panel A: ELISA quantification of chromatin-bound KIN17 protein. Anchored nuclear proteins were resuspended in RIPA buffer and analyzed by ELISA. KIN17 protein levels were expressed either as KIN17 molecules per cell (black squares and left scale) or as picograms of KIN17 per microgram of total protein (open squares and right scale). The figure shows the mean of two quantifications. Panel B: Western blot analysis of KIN17 protein content. The equivalent of 10^5 cells per slot were loaded and proteins separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel. KIN17 protein was revealed with a mixture of both purified IgG K36 + K58.

TABLE 1
Ectopic Overexpression of Human and Mouse KIN17 Proteins Dramatically Decreased the Clonogenic Cell Growth of Transfected Human Cells

Vectors	Cell line			
	HEK 293	H1299	RKO	HCT 116
pEBVCMVEGFP	100.0% ± 9.9%	100.0% ± 12.4%	100.0% ± 6.5%	100.0% ± 10.4%
pEBVCMVasEGFP	102.8% ± 4.5%	101.1% ± 2.2%	104.1% ± 0.9%	108.8% ± 3.2%
pEBVCMV _{MMU} KIN17	47.6% ± 3.9%	5.6% ± 1.1%	13.7% ± 1.4%	1.6% ± 0.0%
pEBVCMVas _{MMU} KIN17	16.0% ± 3.8%	164.0% ± 22.5%	107.9% ± 4.2%	81.6% ± 6.4%
pEBVCMV _{HSA} KIN17	6.5% ± 1.5%	2.2% ± 0.0%	1.4% ± 0.4%	1.6% ± 0.0%
pEBVCMVas _{HSA} KIN17	26.2% ± 4.3%	158.4% ± 3.4%	98.9% ± 10.2%	103.2% ± 5.6%

Notes. Each point corresponds to three dishes. Values correspond to percentages survival ± SD.

Our results showed a correlation between KIN17 and RPA70 protein content. Indeed, the four cell lines expressing the highest KIN17 protein levels as shown by Western blotting (H1299, K562, HEK 293 and KHOS 240S cells) also displayed elevated RPA70 protein levels (Fig. 1B, lanes 5, 7, 10 and 13). In contrast, no relationship was observed between expression of TP53 and KIN17 proteins. Among the four cell lines that overexpressed TP53, HT29 (mutant TP53), HEK 293 (stabilization of TP53 by the 55-kDa E1B in extranuclear corpuscles), KHOS 240S (mutant TP53), and HaCaT (UV-type mutations on both *TP53* alleles), only two exhibited an elevated KIN17 protein level (HEK 293 and KHOS 240S; Fig. 1B, lanes 2, 10, 13 and 14).

We next tested whether ectopic KIN17 protein in cells with elevated endogenous KIN17 protein levels could give rise to cell death as described for mouse *Kin17* (6). After transfection and hygromycin B selection, we observed that an overexpression of either mouse *Kin17* or human KIN17 proteins induced a large decrease in the clonogenic growth of HEK 293, H1299, RKO and HCT 116 cells, with 52, 94, 86 and 98% and 93, 98, 99 and 92% inhibition of colony formation, respectively (Table 1). The human KIN17 protein appeared to be more efficient than its mouse counterpart in blocking cell proliferation, in particular with HEK 293 cells. However, the HEK 293 cells transfected with *KIN17* cDNA could be propagated in culture for several months, while transfected cells exhibited growth disadvantages (data not shown). For an unknown reason, a constant decrease in the clonogenic growth of HEK 293 cells was observed after transfection with anti-sense mouse *Kin17* or human *KIN17* cDNA. Under the same conditions, the number of growing clones in contrast increased with H1299 cells.

Chromatin-Bound Human KIN17 Protein Accumulated after γ Irradiation in Different Cell Lines

Because the KIN17 protein content varied considerably among the human cell lines tested (Fig. 1), we wondered whether the accumulation of radiation-induced chromatin-bound KIN17 protein was a ubiquitous response in human cells. We analyzed endogenous KIN17 protein levels in three human tumor cell lines that had different basal KIN17

levels. We confirmed that the three cell lines used exhibited different constitutive KIN17 protein levels (Fig. 2A). Twenty-four hours after irradiation with doses ranging from 0.5 to 10 Gy, we observed a slight increase in the KIN17 level relative to the total protein content in both RKO and HCT 116 cells at 6 and 10 Gy. Conversely, no induction was generally detectable in H1299 cells (Fig. 2A); however, the amount of KIN17 protein in H1299 cells may be too high to allow detection of any modification.

To discriminate the chromatin-bound from the detergent-soluble protein fractions, we used buffer N containing 1% Igepal[®] and recovered each fraction separately. Different time-course experiments were undertaken with these cells, and a dose-dependent increase in chromatin-bound KIN17 protein was observed 24 h after irradiation, after the completion of DNA repair (Fig. 2B and data not shown). Therefore, the recruitment of KIN17 protein onto the chromatin after irradiation appeared to be independent of the cell type used. While no variation in the chromatin-bound PCNA fraction was detected in HCT 116 and H1299 cells, a slight accumulation was observed in RKO cells at 10 Gy, as reported previously (9, 17). The p34^{cdc2} protein was found mainly in the detergent-soluble fraction and was induced in a dose-dependent manner. Strikingly, RPA70 presented an expression profile similar to that of KIN17 protein. While RPA70 was found mainly in the detergent-soluble fraction in mock-irradiated cells, radiation induced a dose-dependent increase in the chromatin-bound RPA70 protein content in both RKO and H1299 cells.

In parallel, we analyzed the efficiency of the cell cycle arrest induced by radiation by flow cytometry analysis of cells pulse-labeled with BrdU. RKO and HCT 116 cells were pulse-labeled with 30 μ M of BrdU for 15 min before fixation. Incorporation of BrdU into cellular DNA was measured by FACS analysis to assess the percentage of S-phase cells actively synthesizing DNA (Fig. 3A). We observed that 6 Gy irradiation induced a drastic G₂ arrest in both cell lines.

Etoposide Treatment Induced an Accumulation of KIN17 Protein in RKO and HCT 116 Cells

We sought to determine whether other agents generating DNA DSBs could trigger an accumulation of chromatin-

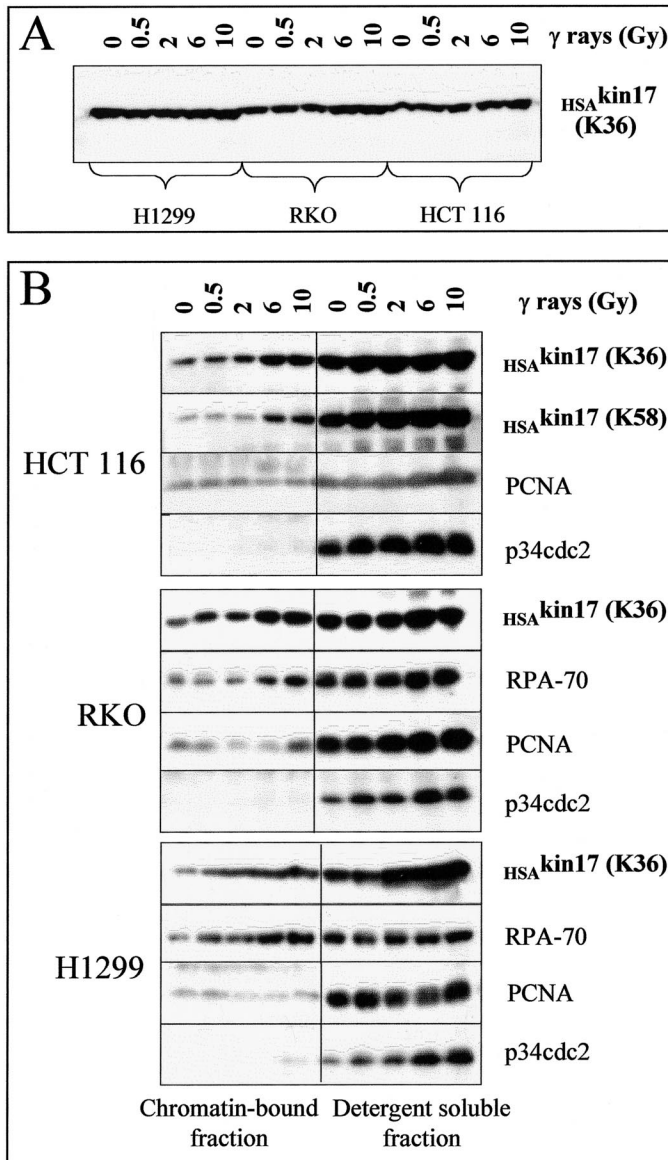


FIG. 2. Chromatin-bound KIN17 (HSA^{kin17}) protein is recruited 24 h after irradiation independently of the cell type used. HCT 116, RKO and H1299 cells were seeded 3 days before irradiation and recovered by trypsinization 24 h later. Cells were lysed with either (panel A) Laemmli buffer or (panel B) buffer N to collect the chromatin-bound fraction and detergent-soluble fraction separately as described in the Materials and Methods. For each cell line, the equivalent of 100,000 cells were loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel. The experiment was performed twice.

bound KIN17 protein. We treated RKO and HCT 116 cells with etoposide (VP-16), a specific inhibitor of topoisomerase II (topo II), which inhibits DNA synthesis and induces single- and double-strand breaks in DNA. Cells were seeded 3 days before treatment to avoid the effects of serum stimulation and analyzed 24 h after treatment. Both chromatin-bound and detergent-soluble fractions were recovered and analyzed by Western blotting. We observed a dose-dependent increase in the chromatin-bound KIN17 protein in both cell lines (Fig. 3B). In opposition, no variation was detected in the detergent-soluble KIN17 fraction.

Therefore, the KIN17 protein was recruited 24 h after either irradiation or etoposide treatment, which generated DSBs. The effect of etoposide treatment on the cell cycle was determined by flow cytometry analysis of both RKO and HCT 116 cells pulse-labeled with BrdU (Fig. 3A). Etoposide arrested cells in the late S and G₂ phase, which may correspond to the accumulation of DNA-damaged cells.

Radiation and Etoposide Treatment Induced Accumulation of KIN17 Protein in Intranuclear Foci

KIN17 protein coalesced into nucleoplasmic foci 24 h after irradiation in slowly proliferating RKO cells (9). We next sought to determine whether etoposide could also induce such an accumulation. Slowly proliferating RKO and HCT 116 cells were either γ -irradiated or treated with etoposide. As controls for KIN17 staining, we analyzed an RKO clone that overexpressed an antisense KIN17 construct (RASK.5 cells) and its control clone (R482.3) (9). In mock-treated RKO, R482.3 and HCT 116 cells, KIN17 protein was located in the nucleoplasm as punctuate foci with a diffuse staining pattern of weak intensity characteristic of slowly proliferating cells (Fig. 3C). Twenty-four hours after irradiation (6 Gy) or etoposide treatment (10 μ M), KIN17 protein relocated in bright foci into the three cell lines. Thus these colorectal carcinoma cells displayed an accumulation of KIN17 in large intranuclear foci at later times after treatment, which may correspond to remaining DNA lesions. RASK.5 cells displaying a reduced basal KIN17 level failed to concentrate KIN17 protein into nuclear foci after both treatments (Fig. 3C). No staining was detected with the secondary antibody alone (data not shown).

Transient KIN17 Overexpression may Induce Changes in Chromatin Conformation

Because KIN17 protein is involved in DNA replication and is recruited after DNA damage, we tried to determine whether the KIN17 expression profile was correlated with a specific phase of the cell cycle. We used purified IgG from anti-KIN17 mAb and KIN17-positive cells were quantified by flow cytometry. To avoid artifacts, we first designed experiments to characterize the best pair of monoclonal antibodies (specific and negative controls) for accurately detecting KIN17 protein with a reduced background. Different purified IgGs directed against KIN17 were tested, and we chose the IgG K36 (4 μ g per sample). Purified IgG K36 gave rise to intense specific signals in both Western blot and immunocytochemical analysis. In contrast, we used two negative controls: the Cy2[™]-conjugated secondary antibody alone and an isotypic control corresponding to an unspecific IgG. We employed a purified IgG directed against an histidine Tag that had been obtained under the same conditions used for IgG K36. KIN17-positive cells were defined as K36-stained cells gathered in the region delimited by the upper limit of fluorescence produced by the staining using anti-His antibody.

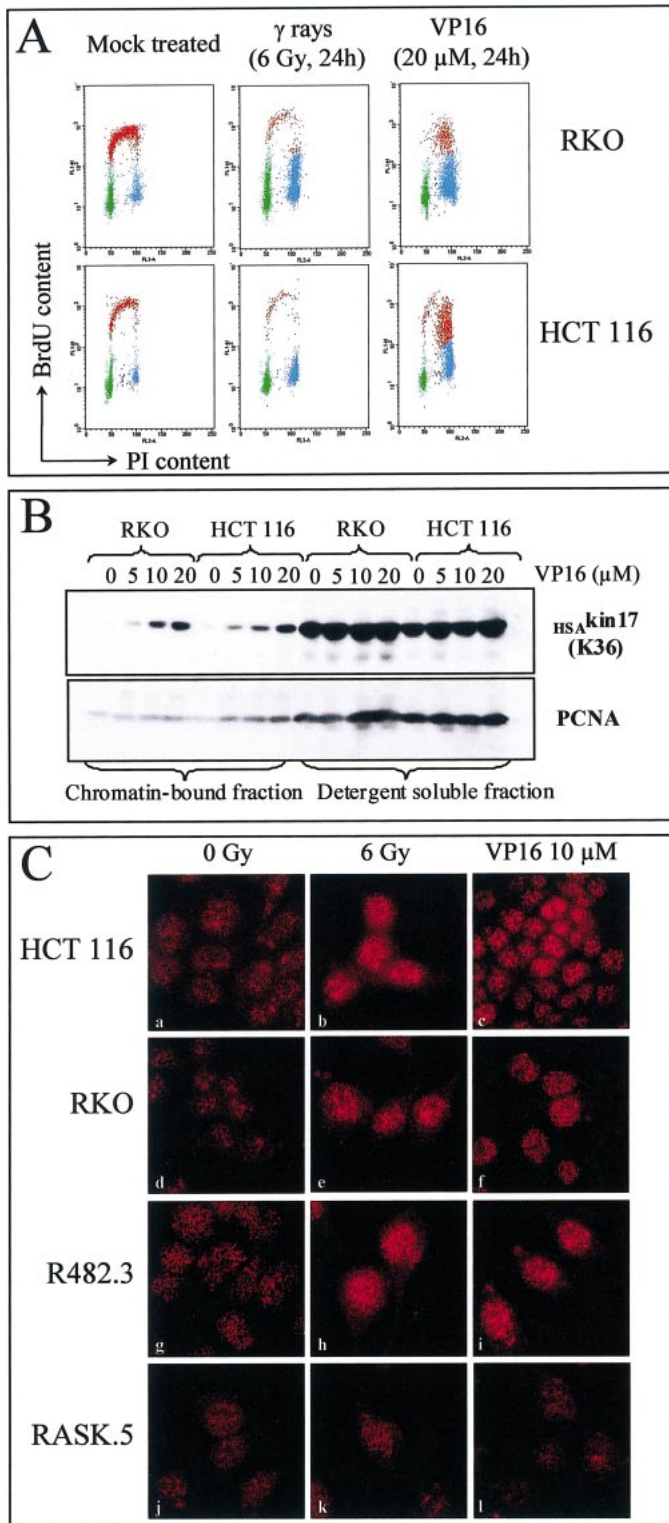


FIG. 3. Etoposide triggers chromatin-bound KIN17 ($_{\text{HSA}}\text{kin17}$) protein complex formation in RKO and HCT 116 cells. Cells were seeded at 5,000 cells/cm² 3 days before treatment and recovered 24 h later with buffer N as indicated in the Materials and Methods. Panel A: Flow cytometric analysis of RKO and HCT 116 cells pulse-labeled with BrdU. BrdU (30 μM) was added to the culture medium for 15 min before fixation of RKO cells, labeling with FITC-conjugated BrdU antibody, and counterstaining with PI. BrdU incorporation is shown as log fluorescence using the FL1-H channel, and relative DNA content (PI) is measured by

We transfected H1299 and RKO cells with pCMVKIN17 plasmid. Transfected cells were analyzed with either immunocytochemical staining (Fig. 4A) or flow cytometry (Fig. 4B). Forty-eight hours after transfection, we observed that Cy2[™]-conjugated antibody alone and purified IgG anti-His stained only a few cells (Fig. 4B). With the IgG K36 we detected 72 and 38% of KIN17-positive cells in RKO and H1299 cells, respectively (Fig. 4B). A biparametric FACS analysis of KIN17 content and DNA content (PI staining) revealed that the uppermost KIN17-positive RKO and H1299 cells shifted in the cell cycle toward higher DNA contents as indicated by arrows in Fig. 4B. Therefore, KIN17 overexpression may modify checkpoint controls or induced defects in chromatin structures.

KIN17 Protein Protects Cells against the Cytotoxic Effects of Radiation

If KIN17 protein acts at the site of DSBs, a decreased KIN17 protein level might increase the sensitivity to radiation. To answer this question, we used RKO clones expressing the *KIN17* antisense transcript and termed RASK cells as described previously (9). Because RASK clones were unstable, we constantly assessed the KIN17 protein content by Western blotting. While an elevated level of KIN17 protein was observed mainly in nuclei of control R482.1 cells, only a weak expression was detectable in both antisense clones (Fig. 5A). In contrast, PCNA protein expression remained stable among control and antisense clones and was distributed in both detergent-soluble and anchored nuclear proteins as mentioned previously. The p34^{cdc2} was detected in the detergent-soluble fraction.

Plating efficiencies of the three clones were assessed after seeding the same number of control and RASK cells per cm². Under these culture conditions, RASK cells exhibited 15-fold lower plating efficiencies than those observed for control clones (9). We observed several clones of small size (less than 10 cells) presenting decreased levels of KIN17 protein, indicating defects in cell proliferation. When control and RASK cells were plated at different densities to account for their specific plating efficiency, we observed a significant increase in the radiosensitivity of RASK cells (Fig. 5B). Actually, after 1 Gy, we observed 64 ± 3 , 57 ± 3 , 39 ± 4

←

FL3-A. Green = G₀/G₁ phase, red = S phase, blue = G₂/M phase. Panel B: The equivalent of 10⁵ mock- or etoposide-treated cells was loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel. The experiment was performed twice. Panel C: Relocalization of KIN17 protein in intranuclear foci 24 h after irradiation or etoposide treatment. Cells were fixed with acetone/methanol (70%/30%) 24 h after treatment. KIN17 protein was revealed using purified antibody IgG K36 and a Cy3[™]-conjugated affinity-purified goat anti-mouse IgG. a, b, c: HCT 116 cells; d, e, f: RKO cells; g, h, i: R482.3 cells; j, k, l: RASK.5 cells. R482.3 and RASK.5 cells were used 21 weeks after transfection and selection (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hygromycin B). Original magnification: 500 \times .

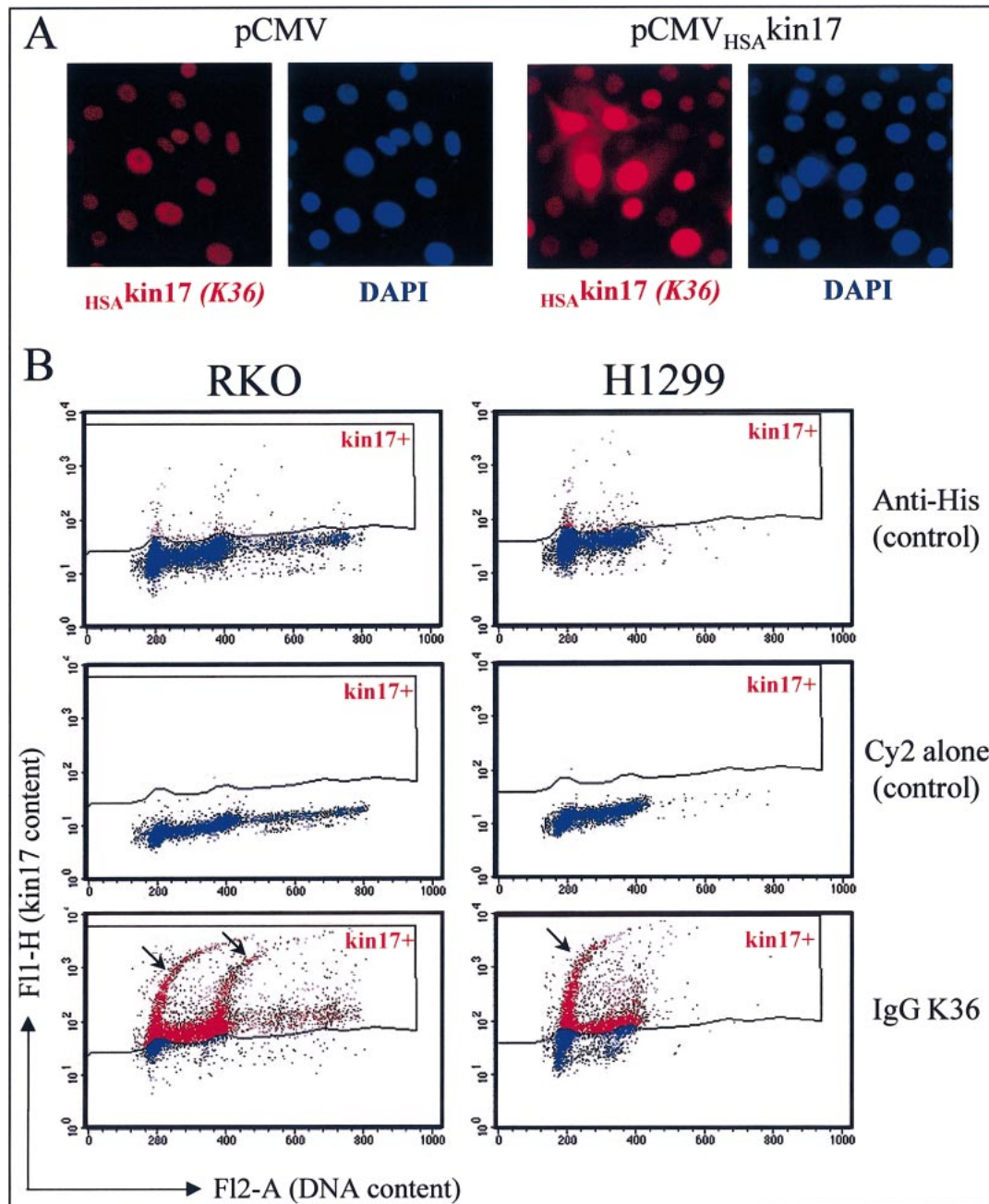


FIG. 4. Transient overexpression of KIN17 (_{HSA}kin17) protein changes the chromatin conformation as judged by flow cytometry. Panel A: Immunocytochemical analysis of pCMVKIN17-transfected cells. Forty-eight hours after transfection, RKO cells were fixed with paraformaldehyde and stained with IgG K36 and DAPI. Panel B: Multivariate flow cytometry analysis of KIN17 protein and DNA 48 h after transfection of RKO and H1299 cells with pCMVKIN17 vector. A total of 20,000 cells gated as single cells on an F12A/FL2W scatter were analyzed. Each experiment was repeated at least three times. Cells were stained with either purified IgG K36, purified IgG anti-His (negative control) or the Cy2[™]-conjugated antibody alone. KIN17-positive cells (kin17+) were gathered in the region delimited by the upper limit of IgG anti-His fluorescence.

and $21 \pm 3\%$ of surviving clones, respectively, for RKO, R482.1, RASK.13 and RASK.5 cells. At 2 Gy, while the survival of RASK clones fell to 9 ± 2 and $5 \pm 1\%$ for RASK.13 and RASK.5 cells, respectively, the survival of controls was maintained at 33 ± 5 and $25 \pm 1\%$ for RKO and R482.1 cells, respectively. The behavior of the parental

RKO cells was similar to that of our control clone (R482.1) carrying an EBV vector that did not contain a reporter gene. This latter observation indicates that the constitutive expression of the EBNA1 protein (through EBV vectors) did not affect cell sensitivity to γ rays. We conclude that a 75% decrease in KIN17 protein content in stable transfected RKO

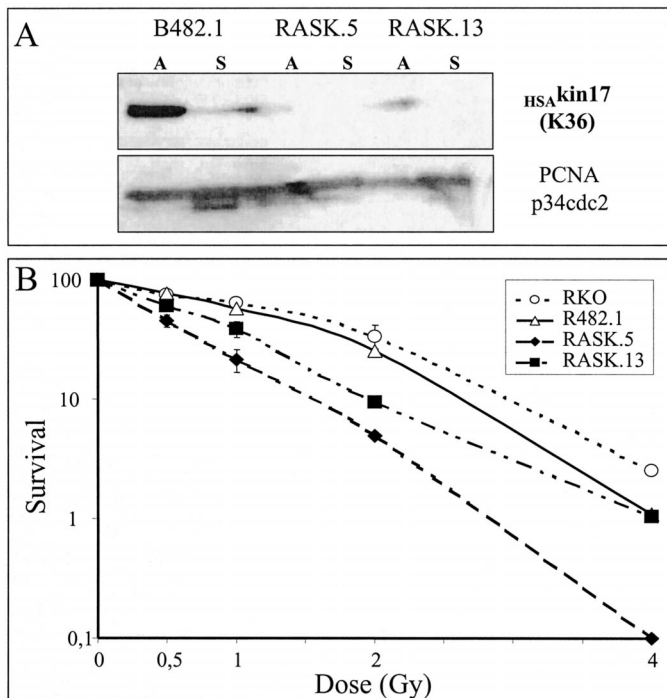


FIG. 5. Increased radiosensitivity of cells displaying low levels of KIN17 ($_{\text{hSA}}\text{kin17}$) protein. Panel A: Twenty weeks after transfection, the KIN17 protein contents was analyzed as described in the legend to Fig. 1. A means anchored nuclear proteins and S corresponds to soluble nuclear and cytoplasmic proteins. Panel B: Twenty-three weeks after transfection, cells were plated at different densities to account for their different plating efficiencies. Culture was performed in the presence of 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hygromycin B. Clones were counted 16 days after seeding. Each point represents the mean of three culture dishes ($\pm\text{SD}$).

cells leads to an enhanced radiosensitivity in the range of doses used (0.5 to 2 Gy).

DISCUSSION

DNA DSBs are one of the most acute threats to cellular integrity because both DNA strands are affected. DNA DSBs can lead to deleterious genomic rearrangements with the loss of genetic information, cell cycle arrest and ultimately cell death (for review see ref. 18). In higher eukaryotes, DSBs can be repaired by either homologous recombination (HRR), single-strand annealing, or nonhomologous DNA end joining (NHEJ) (for reviews see refs. 19, 20). The overall response of a cell to radiation depends on its genetic background as well as its ability to tolerate and correctly repair radiation-induced DNA damage. We demonstrated that the KIN17 protein is involved in and required for the response of cells to agents that generate DSBs.

Because several lines of evidence suggest that the KIN17 protein is an essential protein (Angulo *et al.*, unpublished results), we have determined the KIN17 protein contents in 16 tumor cell lines. Recently, the production of large amounts of human recombinant KIN17 protein in insect Sf9

cells and its subsequent purification to the homogeneity have provided the opportunity to obtain a panel of new monoclonal antibodies (9, 10). This has also afforded us the possibility of precisely analyzing endogenous KIN17 in human cells by using accurate methods such as ELISA. Our results showed that KIN17 was expressed in all 16 cell lines tested with a wide range of expression. H1299 non-small cell lung cancer cells had the highest KIN17 protein level, whereas MeWo melanoma cells had the lowest (100,000 and 4,600 KIN17 molecules per nucleus, respectively). We have also reported elevated KIN17 protein levels in human fibroblasts immortalized with SV40 compared to normal diploid fibroblasts (10). Thus high KIN17 protein content may be a consequence of the tumor phenotype (e.g. uncontrolled proliferation) or a key component of the process of carcinogenesis. However, an overexpression of either mouse Kin17 or human KIN17 protein led to less than 3% colony formation in three tumorigenic cells (RKO, H1299 or HCT 116) compared to controls. This effect was observed irrespective of the *TP53* status of the cell lines tested. Our results suggest that *KIN17* gene expression may be strictly regulated to ensure a beneficial effect on cell proliferation because an excess of KIN17 protein leads to cell death and a decrease in the KIN17 expression-induced growth disadvantage (6, 9). We also found that the expression profile of KIN17 protein appeared to be correlated with the expression of RPA70 protein.

Because cultured human cell lines have a wide range of KIN17 protein expression, we analyzed the expression after γ irradiation in three epithelial cell lines: two human colorectal carcinoma cell lines (RKO and HCT 116) and a non-small cell lung cancer cell line (H1299). We found that chromatin-bound KIN17 protein accumulated in a dose-dependent manner and coalesced in large nuclear foci in these three cell lines. This response did not appear to be specific to the cell type used. In particular, it occurred irrespective of the *TP53* genotype since RKO and HCT 116 cells exhibit a wild-type *TP53* genotype and H1299 cells have a homozygous partial deletion in the *TP53* gene (21, 22). Interestingly, both chromatin-bound KIN17 and RPA70 proteins present a similar pattern of induction. It is noteworthy that the UV-radiation-induced overexpression of the *KIN17* gene is also independent of *TP53* (13).

To ascribe the recruitment of KIN17 protein at sites of DSBs, we analyzed the expression of KIN17 protein after treatment with etoposide, a specific inhibitor of topo II. Topo II is needed during DNA replication and chromosome condensation; it binds covalently to double-stranded DNA, cleaves both strands, and reseals the cleaved complex. Etoposide forms a ternary complex with topo II and DNA. Collisions of topo II-etoposide cleavable complexes with DNA tracking enzymes, such as polymerases or helicases, generate DNA DSBs (23). The resulting DNA DSBs may lead to cell death by apoptosis. Etoposide induced a dose-dependent accumulation of chromatin-bound KIN17 protein 24 h after treatment in RKO and HCT 116 cells and

the coalescence of KIN17 protein into large intranuclear foci, as observed with γ irradiation. Thus the requirement for KIN17 protein during the cellular response to radiation and etoposide appeared to be a late event associated with G₁- and G₂-phase arrests, when the progression of cells through the cell cycle was halted by DNA damage. Because KIN17 recruitment appears after the completion of DNA repair, this reinforces the idea that KIN17 foci are associated with unrepaired or unrepairable DNA lesions. Thus unrepaired DNA damage (e.g. DSBs) may be directly responsible for the recruitment of KIN17 protein. This corroborates our prior observation showing that KIN17 colocalized with RPA70 24 h after irradiation (9). We propose the hypothesis that the KIN17 protein may participate in coupling DNA replication and repair.

Flow cytometry analysis provided new insights into the expression of KIN17 in human cells. Interestingly, in cells transfected with pCMVKIN17, the most KIN17-positive RKO, H1299 and HEK 293 cells shifted in the cell cycle toward higher DNA contents. This observation suggests a disruption in checkpoint controls at both the G₁/S- and G₂/S-phase transitions. However, flow cytometry analysis of BrdU-labeled cells failed to detect any major change in cell distribution (data not shown). An alternative interpretation is that KIN17-overexpressing cells displayed an altered chromatin conformation (presumably decondensation) more accessible to PI dye. Thus KIN17 protein may participate in the coupling of DNA replication and the cell cycle through chromatin remodeling. A similar explanation has been given for two radiosensitive cell lines (ataxia telangiectasia and Fanconi's anemia) that exhibited defects in chromatin structures as shown by fluorimetric titration of PI intercalation (24). Because KIN17 overexpression led to the death of RKO and H1299 cells a few days after transfection, it was impossible to follow the fate of transfected cells.

If KIN17 protein is an essential protein required at the site of unrepaired DNA damage, a decreased level may increase the sensitivity to radiation. The 16 tumor cell lines studied here had major differences in KIN17 protein content. Considering the data reported previously (25), it appears that the KIN17 protein level is not sufficient to predict radiosensitivity. Each cell type has its own radiosensitivity as seen *in vitro*. Nevertheless, in isogenic RKO cells, a low level of endogenous KIN17 protein was associated with a significant increase in radiosensitivity. Unlike the parental RKO cell line and the R482 control clone, RASK cells failed to recruit KIN17 protein after γ irradiation or etoposide treatment and displayed an increased radiosensitivity. At 2 Gy, the cell survival was 5% for RASK.5 cells and 33 and 25% for RKO and R482.1 cells, respectively. It corresponded to a sixfold increase in the radiosensitivity of RASK cells compared to controls. Thus a relevant KIN17 protein level is required for recovery of RKO cells after irradiation. This result raises the possibility that the increased sensitivity of RASK clones to radiation

was a consequence of their difficulty in growing or their accumulation in a radiosensitive stage of the cell cycle. Actually, cellular sensitivity to radiation is markedly different during various portions of the cell cycle (26). This idea fits well with the fact that RASK cells accumulate in very late G₁ and early/mid S phases, two relatively sensitive stages. The biochemical characterization of KIN17 should allow us to determine whether the enhanced radiosensitivity of RASK cells is due only to the irradiation of cells arrested in radiosensitive stages or alternatively is also due to the inactivation of other pathways of DNA metabolism requiring the KIN17 protein.

To conclude, our results show that (1) the KIN17 protein is overproduced in certain tumor cells and that its expression profile is related to that of the RPA70 protein in the presence or absence of DNA damage. The KIN17 protein (2) accumulates *in vivo* at sites of aberrant DNA structures, hampering DNA replication, (3) may induce a change in chromatin conformation, and (4) is required at a suitable and well-defined physiological amount for cell survival after irradiation. Our observations lend support to the idea that the KIN17 protein is involved in DNA replication and in the tolerance of unrepaired DNA damage. Ongoing experiments are designed to unravel the function(s) of the KIN17 protein in the DNA replication, in particular when the progression of DNA replication forks are halted by DNA damage.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Y. Frobert and J. Grassi for advice and support and M. Plaisance, P. Lamourette and M. C. Nevers for their efficient help in producing monoclonal antibodies. We are grateful to Dr. M. F. Poupon, Dr. A. Sarasin, Dr. Z. Ronai, Dr. N. Fusenig, Prof. J. M. Bidart and Dr. E. May for providing cells of the various cell lines. This work was made possible by funds provided by EDF contract no. 8702.

Received: September 4, 2002; accepted: January 7, 2003

REFERENCES

1. J. F. Angulo, P. L. Moreau, R. Maunoury, J. Laporte, A. M. Hill, R. Bertolotti and R. Devoret, Kin, a mammalian nuclear protein immunologically related to *E. coli* RecA protein. *Mutat. Res.* **217**, 123–134 (1989).
2. J. F. Angulo, E. Rouer, A. Mazin, M. C. Mattei, A. Tissier, P. Horéllou, R. Benarous and R. Devoret, Identification and expression of the cDNA of Kin17, a zinc finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5117–5123 (1991).
3. A. Mazin, E. Milot, R. Devoret and P. Chartrand, Kin17, a mouse nuclear protein, binds to bent DNA fragments that are found at illegitimate recombination junctions in mammalian cells. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 435–438 (1994).
4. A. Mazin, T. Timchenko, J. Mènisier-de Murcia, V. Schreiber, J. F. Angulo, G. de Murcia and R. Devoret, Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4335–4341 (1994).
5. T. Timchenko, A. Bailone and R. Devoret, Btcd, a mouse protein that binds to curved DNA, can substitute in *Escherichia coli* for H-NS, a bacterial nucleoid protein. *EMBO J.* **15**, 3986–3992 (1996).

6. D. S. F. Biard, P. Kannouche, C. Lannuzel-Drogou, P. Mauffrey, F. Apiou and J. F. Angulo, Ectopic expression of $_{Mm}$ kin17 protein inhibits cell proliferation and modifies cell morphology of human tumor-derived cells. *Exp. Cell Res.* **250**, 499–509 (1999).
7. P. Kannouche and J. F. Angulo, Overexpression of kin17 protein disrupts nuclear morphology and inhibits the growth of mammalian cells. *J. Cell Sci.* **112**, 3215–3224 (1999).
8. P. Kannouche, P. Mauffrey, G. Pinon-Lataillade, M. G. Mattei, A. Sarasin, L. Daya-Grosjean and J. F. Angulo, Molecular cloning and characterization of the human *KIN17* cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans. *Carcinogenesis* **21**, 1701–1710 (2000).
9. D. S. F. Biard, L. Miccoli, E. Despras, Y. Frobort, C. Créminon and J. F. Angulo, Ionizing radiation triggers chromatin-bound $_{HSA}$ kin17 complex formation in human cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 19156–19165 (2002).
10. L. Miccoli, D. S. F. Biard, C. Créminon and J. F. Angulo, Human kin17 protein directly interacts with the SV40 large T antigen and inhibits DNA replication. *Cancer Res.* **62**, 5425–5435 (2002).
11. D. S. F. Biard, Y. Saintigny, M. Maratrat, F. Paris, M. Martin and J. Angulo, Enhanced expression of the kin17 protein immediately after low doses of ionizing radiation. *Radiat. Res.* **147**, 442–450 (1997).
12. P. Kannouche, G. Pinon-Lataillade, A. Tissier, O. Chevalier-Lagente, A. Sarasin, M. Mezzina and J. F. Angulo, The nuclear concentration of kin17, a mouse protein which binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation. *Carcinogenesis* **19**, 781–789 (1998).
13. C. Masson, F. Mena, G. Pinon-Lataillade, Y. Frobort, S. Chevillard, J. P. Radicella, A. Sarasin and J. F. Angulo, Global genome repair is required to activate *KIN17*, a UVC-responsive gene involved in DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
14. S. K. Choudhary and R. Li, BRCA1 modulates ionizing radiation-induced nuclear focus formation by the replication protein A p34 subunit. *J. Cell Biochem.* **86**, 666–674 (2002).
15. S. H. MacPhail and P. L. Olive, RPA foci are associated with cell death after irradiation. *Radiat. Res.* **155**, 672–679 (2001).
16. C. Blattner, P. Kannouche, M. Litfin, K. Bender, H. J. Rahmsdorf, J. F. Angulo and P. Herrlich, UV-induced stabilization of c-fos and other short-lived mRNAs. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3616–3625 (2000).
17. A. S. Balajee and C. R. Geard, Chromatin-bound PCNA complex formation triggered by DNA damage occurs independent of the ATM gene product in human cells. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1341–1351 (2001).
18. R. S. Maser, K. J. Monsen, B. E. Nelms and J. H. Petrini, hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol. Cell Biol.* **17**, 6087–6096 (1997).
19. J. E. Haber, Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.* **16**, 259–264 (2000).
20. J. H. J. Hoeijmakers, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366–374 (2001).
21. M. K. Bhat, C. Yu, N. Yap, Q. Zhan, Y. Hayashi, P. Seth and S. Cheng, Tumor suppressor p53 is a negative regulator in thyroid hormone receptor signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **272**, 28989–28993 (1997).
22. F. Bunz, A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J. P. Brown, J. M. Sedivy, K. W. Kinzler and B. Vogelstein, Requirement for p53 and p21 to sustain G₂ arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497–1501 (1998).
23. S. Sakamoto, K. Nishikawa, S. J. Heo, M. Goto, Y. Furuichi and A. Shimamoto, Werner helicase relocates into nuclear foci in response to DNA damaging agents and co-localizes with RPA and Rad51. *Genes Cells* **6**, 421–430 (2001).
24. C. S. Djuzenova and M. Flentje, Light scatter and DNA accessibility to propidium iodide of ataxia telangiectasia and Fanconi anemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 365–371 (2001).
25. P. J. Deschavanne and B. Fertil, A review of human cell radiosensitivity *in vitro*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **34**, 251–266 (1996).
26. F. A. Mettler and A. C. Upton, *Medical Effects of Ionizing Radiation*, 2nd ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 1995.

Article III

Article III

Participation de la protéine kin17 aux facteurs de réplication et à d'autres activités du métabolisme de l'ADN assurées par des complexes nucléaires de

hauts poids moléculaires. D.S.F. Biard, L. Miccoli, E. Despras, F. Harper, E. Pichard, C.

Créminon and J.F. Angulo. Mol. Cancer Res. 1, 519–531. 2003.

Dans les cellules en prolifération, la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ se localise en foyers nucléaires ponctuels. Plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN, comme PCNA, présente ce type de localisation (Newport and Yan, 1996). En outre, la sous-expression et la sur-expression de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ ont un effet anti-prolifératif (Article I et Biard et al., 1999). Ces observations posent la question de l'implication éventuelle de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ dans la réplication de l'ADN.

1. La protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ est détectée aux sites de réplication de l'ADN.

La microscopie électronique révèle la co-localisation ultra-structurale de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ endogène et du BrdU aux sites de réplication de l'ADN. De plus, après synchronisation des cellules par traitement à la L-mimosine (MIMO) ou à l'hydroxyurée (HU), la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ est recrutée dans la fraction des protéines associées aux structures nucléaires à l'initiation de la réplication et pendant toute la progression de la phase S. Ces deux résultats plaident pour un rôle de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ dans la réplication de l'ADN. Dans les cellules

Résultats

germinales de souris en phase S, la protéine $MMUkin17$ est également retrouvée aux sites d'incorporation du BrdU (Pinon-Lataillade et al., 2004).

2. La protéine $HSAkin17$ est recrutée au sein de complexes de haut poids moléculaires après un traitement induisant un blocage des fourches de réplication et/ou des DSB.

Différents traitements induisant un blocage des fourches de réplication et/ou des DSB (aphidicoline (APH), hydroxyurée (HU), L-mimosine (MIMO), étoposide (VP16), camptothécine (CPT) et irradiation γ) entraînent une accumulation et une concentration de la protéine $HSAkin17$ associée à la chromatine au sein de larges foyers intra-nucléaires après 24 h. Ces foyers résistent à l'extraction avec un détergent, ce qui suggère une association forte avec les structures nucléaires. L'analyse par gel filtration d'extraits cellulaires (lignée H1299) montre que la protéine $HSAkin17$ est trouvée au sein de trois complexes et co-élue avec les sous-unités de 32 et 70 kDA de la protéine RPA. Le traitement à l'HU entraîne l'augmentation du poids moléculaire des complexes contenant la protéine $HSAkin17$.

Hypothèse :

Notre hypothèse est qu'en présence de dommages de l'ADN, la protéine $HSAkin17$ est recrutée au sein de complexes de haut poids moléculaires et contribue à la liaison entre réplication et réparation de l'ADN. Ces complexes pourraient correspondre aux complexes de réplication de l'ADN.

Participation of kin17 Protein in Replication Factories and in Other DNA Transactions Mediated by High Molecular Weight Nuclear Complexes

Denis S.F. Biard,¹ Laurent Miccoli,¹ Emmanuelle Despras,¹ Francis Harper,² Evelyne Pichard,² Christophe Créminon,³ and Jaime F. Angulo¹

¹CEA, Commissariat à l'Energie Atomique, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, Département de Radiobiologie et de Radiopathologie, Direction des Sciences du Vivant, Fontenay-aux-Roses, France; ²CNRS, Institut André Lwoff, FR2249, UPR 1983, Génétique moléculaire et intégration des fonctions cellulaires, Villejuif Cedex, France; and ³CEA, Commissariat à l'Energie Atomique, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, Département de Recherche Médicale, Direction des Sciences du Vivant, CE Saclay, Gif-sur-Yvette, France

Abstract

The *Homo sapiens* kin17 ($_{\text{HSA}}\text{kin17}$) protein is a chromatin-associated protein conserved during evolution and overproduced in certain human tumor cell lines. For the first time, immunoelectron microscopy analysis of endogenous $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ protein revealed an ultrastructural co-localization of $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ and bromodeoxyuridine (BrdUrd) at sites of DNA replication after either short (15 min) or long (120 min) pulses of BrdUrd labeling. After hydroxyurea (HU) or L-mimosine (Mimo) block and withdrawal, we observed that $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ was recruited onto the chromatin during the re-entry and the progression in the S phase. These results are consistent with a major role of $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ protein in DNA replication factories. Other treatments hampering replication fork progression and/or inducing double-strand breaks also triggered an accumulation and a concentration of the chromatin-bound $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ protein into large intranuclear foci 24 h post-treatment. Moreover, HU- and Mimo-induced $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ foci were retained in the nucleus after detergent extraction, suggesting a strong association with nuclear structures. Gel filtration analyses of cellular extracts showed that endogenous $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ protein co-eluted with both replication proteins RPA32 and RPA70 in a fraction containing complexes of M_r 600,000. Interestingly, HU-induced G₁-S arrest triggered an increase in the molecular weight of complexes containing $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ protein. Hence, treatments interfering with either initiation and/or elongation of DNA replication also recruited chromatin-bound $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ protein. We hypothesize that in the presence of unrepaired DNA damage, $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ protein concentrated into high molecular weight complexes probably to create a bridge that contributes to the harmonization of DNA replication and repair.

Introduction

Several attempts have been undertaken to identify eukaryotic proteins that assemble onto chromatin to mediate the once-per-cell-cycle replication and to coordinate replication with the progression in the cell cycle especially after DNA damage. These regulatory factors are located in specific nuclear compartments, termed replication factories, where DNA replication occurs (1, 2). Certain proteins involved in DNA metabolism localize in discrete intranuclear foci, including the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and DNA polymerase α -primase, which co-localized with sites of newly synthesized DNA (see 3). We have recently identified the *Homo sapiens* kin17 ($_{\text{HSA}}\text{kin17}$) protein as a nuclear protein directly associated with the chromatin as evidenced by *in vivo* cross-linking experiments and involved in SV40-dependent DNA replication (4, 5). $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ appeared to be among the proteins tightly associated with DNA such as core histones and SAF-A (scaffold attachment factor A, also termed hnRNP-U) (6, 7). Like core histones or SAF-A, $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ was efficiently coupled to chromatin after 2–4 min cross-linking. This observation suggests that $_{\text{HSA}}\text{kin17}$, core histones, and SAF-A proteins are directly and strongly associated with DNA. Kin17 are nuclear zinc-finger and DNA-binding proteins highly conserved from yeast to human, which have been identified with antibodies directed against the bacterial *Escherichia coli* RecA protein (8, 9). The mouse $_{\text{MMU}}\text{kin17}$ protein, which is 92% identical to its human counterpart, preferentially binds *in vitro* to double-stranded DNA with a curved topology (10, 11). Transient overexpression of human $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ protein arrests cell proliferation of human tumor cells in culture (12). $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ is stress activated after UVC or ionizing radiation (IR) (4, 13, 14).

The physical interaction between human $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ protein and the SV40 large T antigen inhibits DNA synthesis *in vitro* and *in vivo*, suggesting a direct involvement in DNA replication (5). Furthermore, antisense $_{\text{HSA}}\text{KIN17}$ clones which failed to recruit $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ protein after γ irradiation exhibited major defects in the S-phase progression as evidenced by flow cytometry analysis of pulse-bromodeoxyuridine (BrdUrd)-labeled cells (4). There is a correlation between $_{\text{HSA}}\text{kin17}$, DNA replication, and DNA damage, because these antisense clones displayed 6-fold increase in their radiosensitivity in comparison with controls, suggesting an impaired tolerance to DNA damage (12). Blattner *et al.* (15) have also highlighted a link between the presence of UV-induced DNA damage and the

Received 1/10/03; revised 3/10/03; accepted 3/25/03.

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.

Grant support: EDF contract no. 8702.

Requests for reprints: Denis S.F. Biard, CEA-DSV-DRR, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, BP 6, 92265 Fontenay aux Roses, France.
E-mail: biard@dsvidf.cea.fr

Copyright © 2003 American Association for Cancer Research.

mouse *MMU*KIN17 pathway in Δ XPA mouse cells. Furthermore, the integrity of the human *global genome repair* is crucial for the up-regulation of *HSA*KIN17 gene. In particular, the presence of functional XPA and XPC proteins is a prerequisite for the up-regulation of *HSA*KIN17 gene expression after UVC (13). Interestingly, XPA, XPC, and replication protein A (RPA) have been implicated in DNA damage recognition (16). Together, our results indicate that *HSA*KIN17 gene may help to overcome damage provoked by several types of genotoxic stress.

Recently, we have detected a wide diversity of HSAkin17 protein expression among 16 cell lines in culture. In non-small cell lung cancer H1299 cells, chronic myelogenous leukemia K562 cells, and immortalized embryonic kidney HEK 293 cells, HSAkin17 is a relatively abundant protein (10^5 molecules per cell nucleus). Strikingly, melanoma MeWo cells present low levels of HSAkin17 protein (4.5×10^3 molecules per cell nucleus) (12). In most of the cells, these contents are near to that observed for other nuclear proteins involved in DNA metabolism such as RPA (3×10^4 to 2×10^5), ligase I (10^5), DNA pol β (5×10^4), or Ogg 1 (1.23×10^5) (17, 18). The endogenous HSAkin17 protein exists in two distinct pools in cultured human cells and the balance between them depends on the physiological state of the cells. The major pool is extracted from cells under isotonic conditions and a non-ionic detergent (detergent-soluble fraction). The minor pool corresponds to the chromatin-bound fraction (or detergent-insoluble fraction) (4). Similar results have been reported for other essential proteins involved in DNA replication such as RPA70 and PCNA (18, 19). The chromatin-bound HSAkin17 fraction is enriched in a dose-dependent manner 24 h after IR or etoposide treatment, both of them creating double-strand breaks (DSBs) (4, 12). RPA70 binds to chromatin at the onset of S phase forming discrete foci that co-localize with sites of early-, but not late-replicating chromatin. Interestingly, detergent-insoluble forms of RPA70 and PCNA co-localized with active S-phase DNA replication forks (20). A co-localization between HSAkin17 and RPA70 proteins has been observed after lasting DNA damage, reinforcing the idea that HSAkin17 accumulated at sites of unrepaired DNA damage (4).

Herein, we demonstrate for the first time, that the HSAkin17 protein strictly localizes at sites of DNA replication by immunoelectron microscopy after BrdUrd labeling. We also show that chromatin-bound fraction of HSAkin17 protein was recruited during the re-initiation of DNA replication and the progression throughout the S phase after either hydroxyurea (HU) or L-mimosine (Mimo) blocks followed by drug withdrawal. Both Mimo- and HU-induced HSAkin17 foci were preserved in attached cells after detergent extraction in cells, indicating a strong association of HSAkin17 with nuclear structures during late G₁ and early S phases. Gel filtration analysis revealed that endogenous HSAkin17 protein was distributed into three protein complexes of M_r 400,000, 600,000, and 1,800,000. HSAkin17 and RPA co-eluted in a M_r 600,000 elution fraction, which certainly contained replication complexes. These observations support that HSAkin17 plays a role in DNA replication during normal cell division. We extended our study by demonstrating that drugs known to interfere with elongation of DNA replication and

generating DSBs in the DNA also triggered increased chromatin-bound HSAkin17 protein levels. Gel filtration analysis demonstrated a shift of the HSAkin17 protein to complexes of higher molecular weight upon HU treatment. After HU treatment, HSAkin17 was mainly concentrated into two complexes of M_r 1,000,000 and 2,000,000.

Collectively, our results highlighted that HSAkin17 may be a component of DNA replication factories. In the presence of unrepaired DNA damage, HSAkin17 concentrated into high molecular weight complexes that may create a bridge between DNA replication and DNA repair.

Results

Ultrastructural Localization of HSAkin17 Protein During DNA Replication

HSAkin17 protein is directly bound to chromatin *in vivo* in cultured human cells. Furthermore, the immunocytochemical localization of HSAkin17 is similar to those of different proteins involved in DNA replication such as RPA (4, 5). Therefore, we analyzed the nuclear distribution of HSAkin17 protein in rapport to the replication sites. We localized HSAkin17 protein inside nuclei of non-synchronous proliferating cells by immunoelectron microscopy after pulse BrdUrd labeling. Cells were pulse-labeled with BrdUrd for 15 or 120 min and specimens were processed for immunoelectron microscopy analysis and labeled with anti-BrdUrd and anti-HSAkin17 antibodies. In this approach, we used a mix of two monoclonal antibodies (purified immunoglobulins Ig K36 and Ig K58) known to recognize different parts of the recombinant HSAkin17 protein. BrdUrd was revealed with 10-nm-diameter gold particles and HSAkin17 with 5 nm particles as mentioned in the legend of Fig. 1. We show two representative images obtained with proliferating RKO cells.

HSAkin17 protein was detected in almost all of the BrdUrd foci scattered throughout the nucleoplasm, particularly in the peripheral chromatin 15 min after BrdUrd labeling (Fig. 1A, *large arrows*). Slowly proliferating cells presented 90% of the HSAkin17 grains in the vicinity of BrdUrd incorporation sites. Because the ultrastructural co-localization of BrdUrd with either PCNA or cyclin A has been previously demonstrated (21), it is likely that these HSAkin17/BrdUrd foci correspond to DNA replication domains as described elsewhere (22). Note that RKO cells displayed a chromatin structure essentially in a dispersed state as several rapidly proliferating tumor cells. After 120 min of BrdUrd incorporation, HSAkin17 protein foci overloaded almost all the BrdUrd foci corresponding to newly synthesized DNA (Fig. 1B). These HSAkin17/BrdUrd foci were larger and propagated either in the chromatin surrounding the nucleolus or in huge domains close to the lamina, certainly at sites of perinuclear and intranuclear dense chromatin. Note that few HSAkin17 foci did not overlap BrdUrd dots (Fig. 1, A and B, *small arrows*). Similar results were obtained with MRC5-V2 human fibroblasts immortalized with SV40 virus (data not shown).

To conclude, these results indicate the presence of HSAkin17 protein in nearly all DNA replication sites in the absence of genotoxic injuries. These sites might correspond to the so-called replication factories (22). We also observed that the HSAkin17 protein remains on newly replicated DNA.

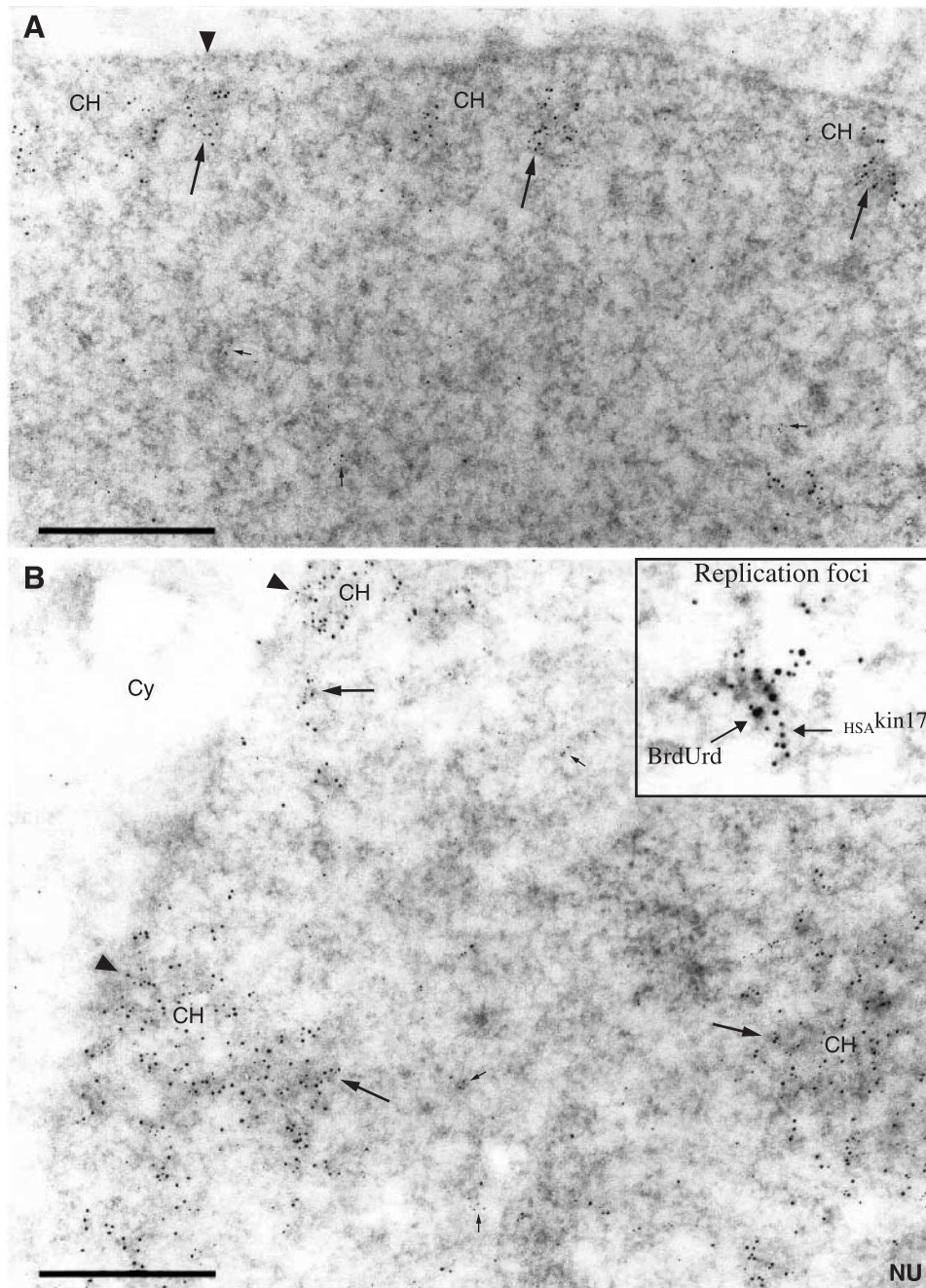


FIGURE 1. $HSAkin17$ protein co-localized with BrdUrd-incorporating sites at the ultrastructural level. Slowly proliferating RKO cells were labeled with BrdUrd for 15 min (A) or 120 min (B). Ultrathin sections were prepared for immunoelectron microscopy as indicated in "Materials and Methods." BrdUrd was stained with a rat anti-BrdUrd antibody while $HSAkin17$ protein was identified with a mix of two monoclonal antibodies (purified Ig K36 and Ig K58). Large gold particles (10 nm) indicate the incorporation of BrdUrd and small gold particles (5 nm) reveal $HSAkin17$ protein labeling. CH, dense chromatin; NU, nucleolus; Cy, cytoplasm. Arrowheads, lamina; large arrows, point to co-localization of $HSAkin17$ and BrdUrd; small arrows, point to $HSAkin17$ foci alone. Representative microphotographs are shown. Scale bar, 0.5 μ m.

Stalled Replication Forks Induced by DNA Synthesis Inhibitors Triggered Accumulation of Chromatin-Bound $HSAkin17$ Protein

Because $HSAkin17$ protein localized at sites of DNA replication and appeared to participate in this process, we sought to determine whether $HSAkin17$ remained bound to the

sites of stalled replication forks. We first assessed the efficiency of the cell cycle arrest induced by replication inhibitors, by means of flow cytometry analysis. The percentages of S-phase cells actively synthesizing DNA were assessed after short incorporation of BrdUrd into cellular DNA (Fig. 2A). In RKO cells, the $HSAkin17$ immunocytochemical pattern depended on

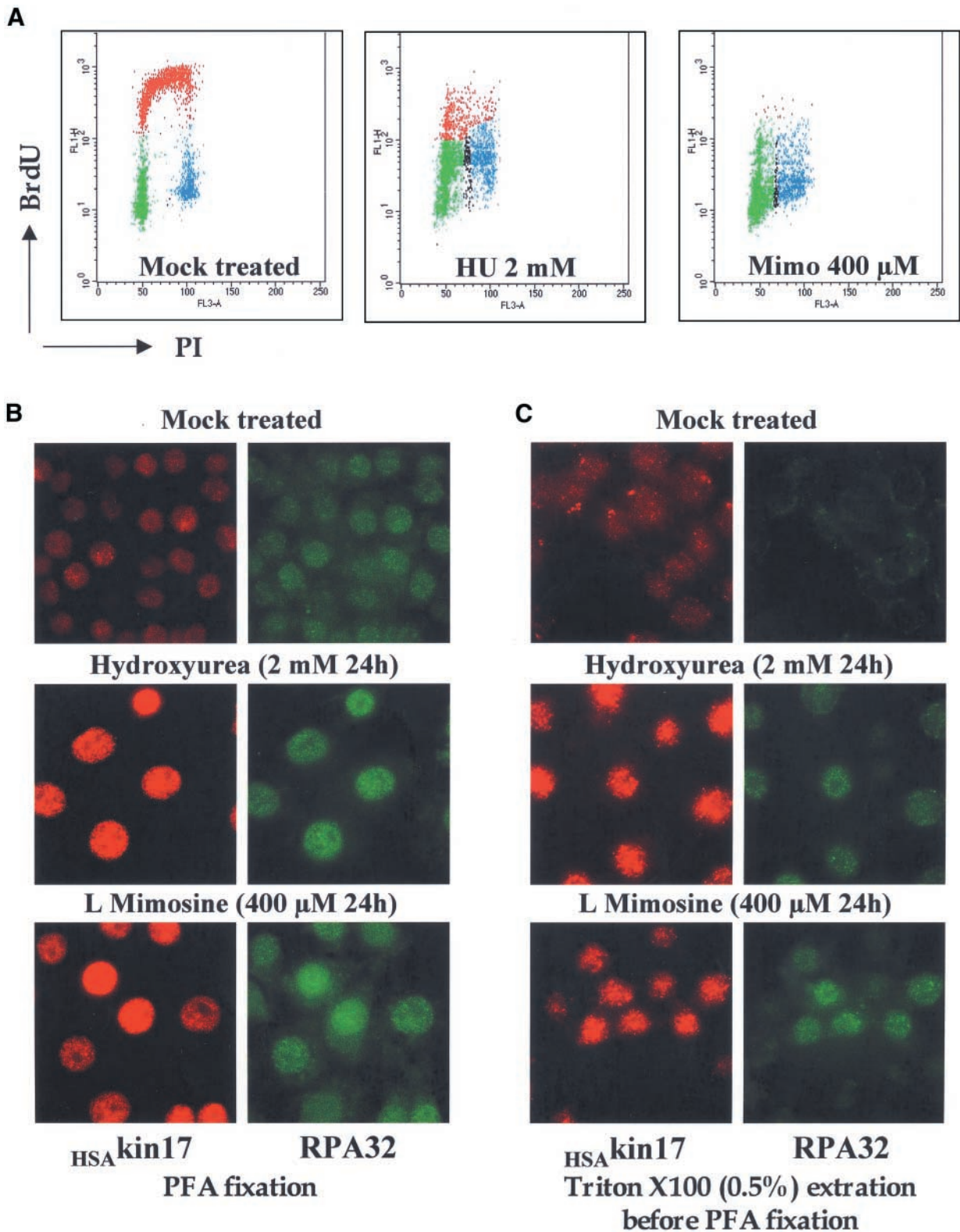


FIGURE 2. Recruitment of *HSA*kin17 tightly associated with a DNA structure 24 h after HU and Mimosine treatment. RKO cells were seeded 4 days before treatment, treated with HU (2 mM) or Mimosine (400 μ M), and analyzed 24 h later. **A.** Flow cytometry analysis of BrdUrd-labeled cells. BrdUrd (30 μ M) was added to the culture medium for 15 min before fixation and cells were labeled with FITC-conjugated BrdUrd antibody and counterstained with propidium iodide. BrdUrd incorporation is shown as log fluorescence using the FL1-H channel and relative DNA content (propidium iodide) is measured by FL3-A. *Green*, G₀-G₁ phase; *red*, S phase; *blue*, G₂-M phase. **B.** Immunocytochemical staining of *HSA*kin17 24 h after HU and Mimosine treatment. RKO cells were fixed with PFA (4%, 20 min and permeabilized with Triton X-100 for 5 min) or **C.** Proteins were extracted with Triton X-100 for 5 min before PFA fixation.

their proliferation rate. While highly proliferating cells exhibited an intense dot-like nuclear staining, slowly proliferating cells and resting cells elicited a dramatic decrease in this staining. Therefore, cells were plated 4 days before recovery and displayed low endogenous levels. Hence, asynchronously and slowly proliferating RKO cells were treated with either HU (2 mM) or Mimo (400 μ M) for 24 h. Cells were pulse-labeled with 30 μ M of BrdUrd for 15 min before fixation.

We used HU and Mimo to perturb DNA replication. HU is known to reduce the deoxynucleotide triphosphate pool and to block the elongation of DNA replication. HU treatment resulted in a population of RKO cells predominantly stalled at the G₁-S border and in very early S phase (Fig. 2A). Mimo induces a cell cycle arrest of human cells in late G₁ phase close to the G₁-S border, before the establishment of active DNA replication forks (23). Under our conditions, an overnight treatment of RKO cells with 400 μ M Mimo resulted in a population synchronized in late G₁ phase before entry into S phase (Fig. 2A). We detected a clear increase in the intranuclear amount of HSAkin17 protein [without Triton X-100 extraction before paraformaldehyde (PFA) fixation] after either HU or Mimo treatment in RKO cells (Fig. 2B). Note that more intense stainings were obtained after PFA fixation as compared to acetone/methanol fixation (Fig. 2B *versus* Fig. 4C). Under these conditions, the immunocytochemical detection of HSAkin17 protein was similar to that of RPA32. The *in situ* detection of the chromatin-bound HSAkin17 protein in attached cells was performed after detergent extraction. Cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in modified CSK buffer (for 5 min) to remove soluble cytoplasmic and nuclear proteins and then fixed. Under this condition, remaining HSAkin17 and RPA32 proteins were detected in nuclear aggregates (Fig. 2C). In mock-treated cells, HSAkin17 protein was barely visible after detergent extraction.

Our data indicate that HU or Mimo treatment provokes the concentration of a fraction of the nuclear HSAkin17 protein onto particular nuclear structures (chromatin and nuclear matrix) at sites of stalled replication forks.

The DNA Replication Re-Start Observed After Either HU or Mimo Treatment Correlates With Increased Levels of HSAkin17 Protein

Because HSAkin17 protein seems associated to sites of DNA replication as evidenced by immunoelectron microscopy, we sought to determine a relationship with the progression (or alternatively the arrest) of replication forks. Cells were seeded 4 days before treatment and confluent cells were treated with either HU (2 mM) or Mimo (400 μ M) for 24 h. At different times following drug removal, cells were analyzed for either DNA content (flow cytometry) or HSAkin17 protein content (Western blot). Cytoplasmic and soluble nuclear proteins (soluble fraction) and chromatin-bound proteins (insoluble fraction) were recovered separately and analyzed as reported (4).

The determination of the DNA content by means of propidium iodide and flow cytometry clearly revealed that HU-treated cells re-entered into the S phase more rapidly than Mimo-treated cells (Fig. 3A). Cells arrested in late G₁-early S phase after the HU treatment progressed in the cell cycle 1 h after drug withdrawal and crossed over the S phase 3 and 6 h

later. Cells got out the S phase 9 h after drug removal. In opposition, Mimo-treated cells blocked in late G₁, re-entered into the S phase only 6 h after drug withdrawal, and passed through the S phase at 9 h (Fig. 3B). During this period, different kinetics of HSAkin17 protein recruitment were observed. After 24-h HU treatment, HSAkin17 protein content increased in both soluble and DNA-bound protein fractions (Fig. 3C). When cells traversed the S phase, a regular increase of DNA-bound HSAkin17 was observed accompanied by a decrease in the soluble fraction. In confluent RKO cells, HU withdrawal induced a similar protein expression profile for PCNA. On the contrary, cyclin A protein recruitment was mainly detected in the fraction of proteins weakly associated with DNA structures at early times following HU withdrawal, suggesting a rapid re-entry of cells into the S phase. After Mimo treatment, cells encountered major hindrances to enter into the S phase and remained blocked at the G₁-S border for a longer period of time. As a consequence, we observed elevated DNA-bound HSAkin17 protein levels during the whole period of time, as well as an increased cyclin A (soluble fraction) protein content (Fig. 3D).

Our data revealed that the amount of HSAkin17 protein increases during the re-initiation of DNA replication as well as during the progression through the S phase, suggesting its recruitment in the so-called replication factories.

HSAkin17 Protein Is Recruited During Initiation and/or Elongation of DNA Replication

To further investigate the relationship between replication and the intranuclear concentration of kin17 protein, we treated RKO cells for 24 h with agents able to inhibit the elongation of DNA replication. Slowly proliferating cells were treated with Mimo (400 μ M), aphidicolin (APH, 15 μ M), HU (2 mM), camptothecin (CPT, 0.1 μ M), VP16 (20 μ M), or γ irradiation (6 Gy).

We determined the efficiency of the cell cycle arrest induced by these replication inhibitors (Figs. 2A and 4A, and 12). APH, an inhibitor of DNA polymerase α and δ , blocks the elongation of DNA replication and APH-treated cells accumulated in early S phase (Fig. 4A). We also tested drugs which interfere with either DNA topoisomerase I or II (topo I and topo II) creating single- and DSBs in DNA. CPT interferes with the resealing activity of topo I. This stabilizes a topo I-DNA intermediate which hampers the religation of topo I-linker single-strand breaks creating DNA damage (*e.g.*, DSBs). VP16 is a specific inhibitor of topo II. Interestingly, DNA replication can initiate in the absence of both enzymes, but elongation stops after a couple of thousand base pairs. While CPT exerts its effect predominantly during the mid and late S phase of the cell cycle, VP16 leads to an arrest of cells in the late S phase (Fig. 4A and 12). Treatment with one of these drugs resulted in a prominent G₂ arrest, which may correspond to the accumulation of DNA-damaged cells.

HU-treatment increased the level of chromatin-bound HSAkin17 protein followed by the relocalization of HSAkin17 protein in dot-like structures with a pattern characteristic of replication foci (Fig. 4, B and C; Fig. 2B). This result suggests that stalled replication forks due to nucleotide deprivation in early S phase recruited DNA-bound HSAkin17 protein. We cannot rule out the possibility that HSAkin17 protein was also required after HU-induced DSBs. Furthermore, HSAkin17

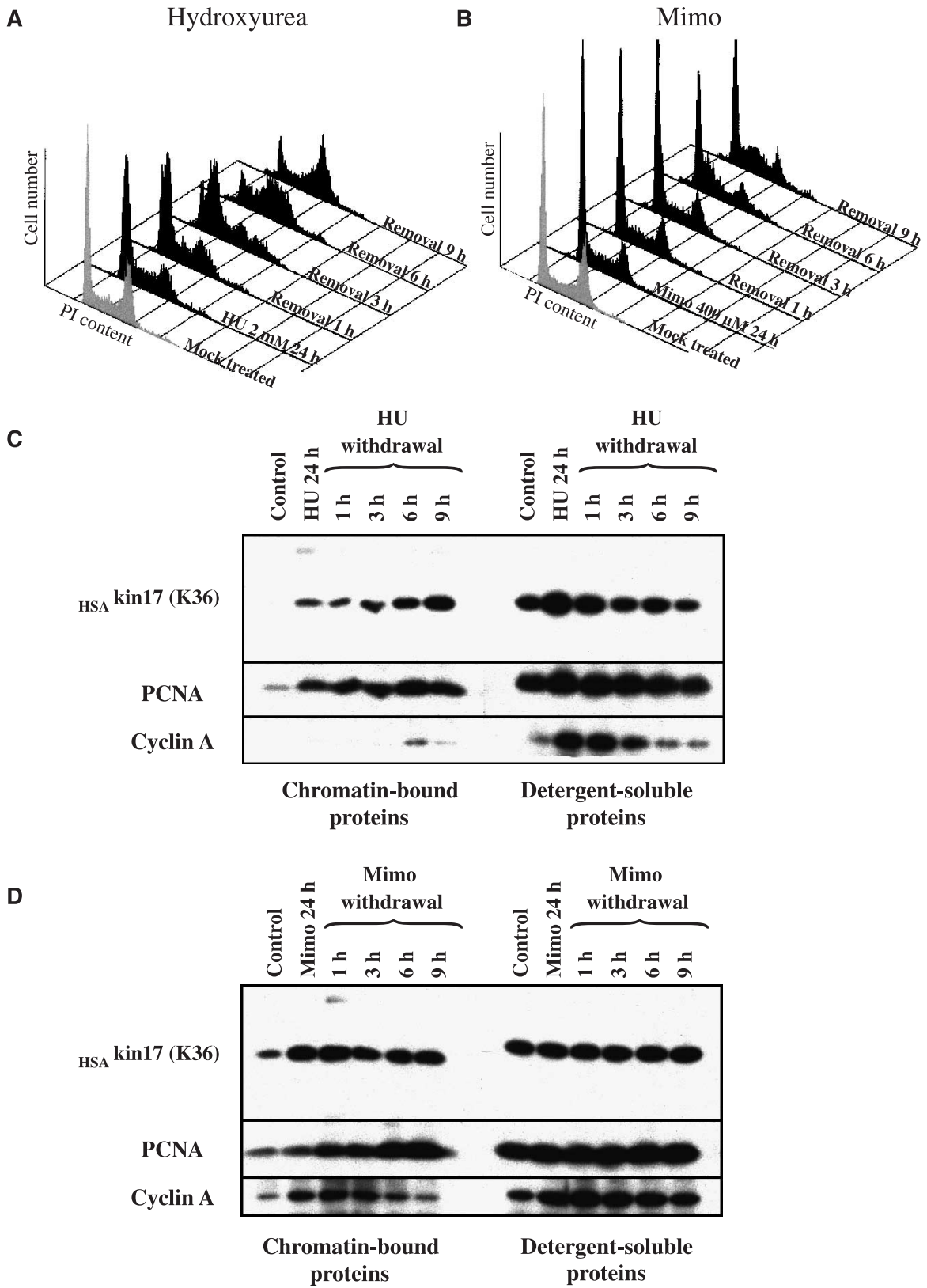


FIGURE 3. Chromatin-bound *HSA*kin17 protein levels increased during the re-initiation of DNA synthesis and the progression into the S phase. RKO cells were seeded 4 days before treatment with either HU (2 mM) or Mimosine (400 μM). Twenty-four hours later, fresh medium was added and cells were recovered at the indicated times. **A, B.** Cell cycle analysis of RKO cells after either HU or Mimosine blocks. **C, D.** *HSA*kin17 protein content analysis after either HU or Mimosine blocks. At the indicated times, cells were trypsinized, counted, and lysed in the buffer N to recover separately *chromatin-bound proteins* and *detergent-soluble proteins*. Proteins were analyzed by Western blot.

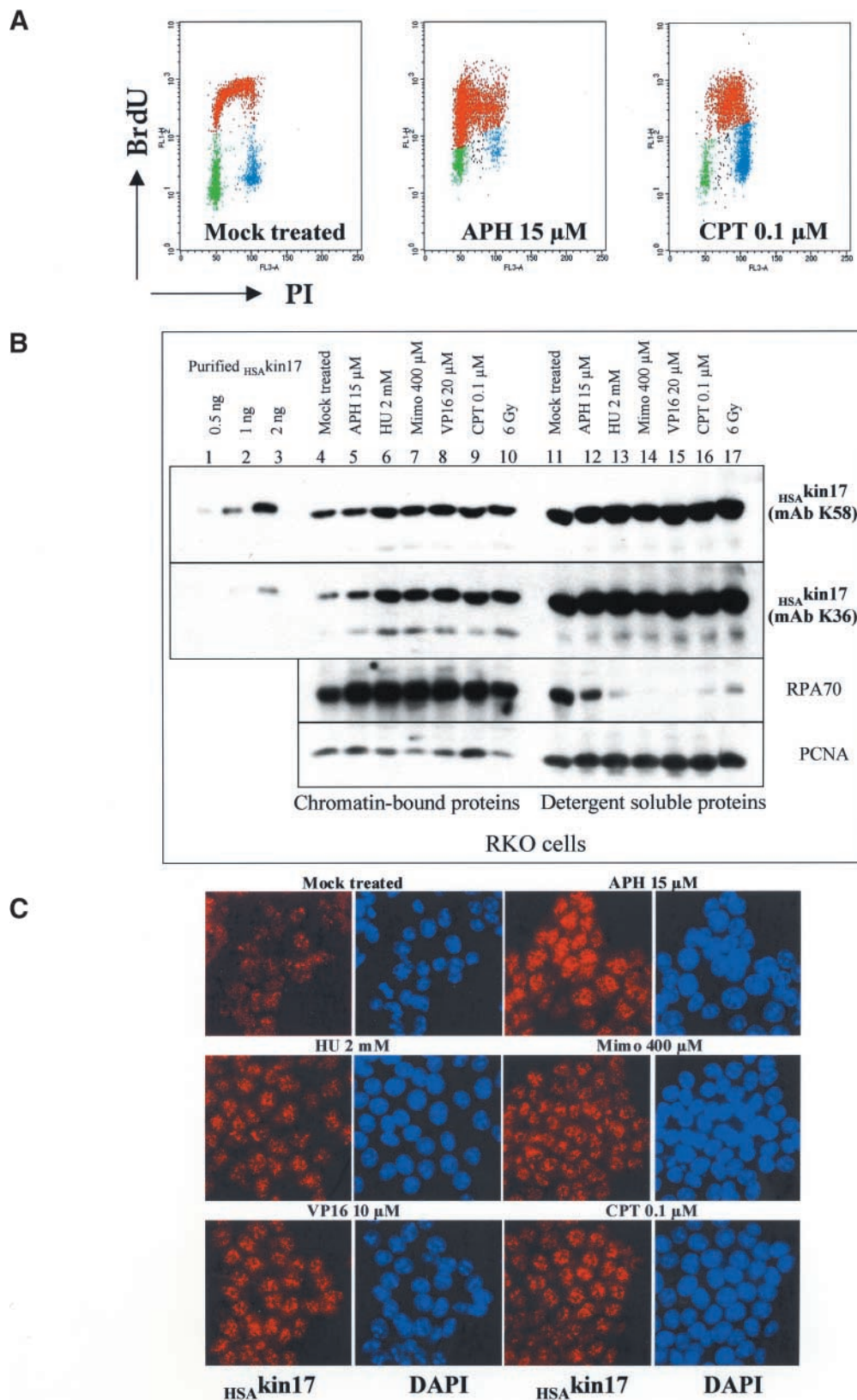


FIGURE 4. Stalled replication forks and DSBs triggered the accumulation of the chromatin-bound $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ protein in RKO cells. RKO cells were seeded 4 days before treatment and analyzed 24 h later. **A.** Flow cytometry analysis of BrdUrd-labeled cells after APH or CPT treatment. **B.** RKO cells were trypsinized, counted, and lysed to recover separately *chromatin-bound proteins* and *detergent-soluble proteins*. Proteins were analyzed by Western blot. **C.** RKO cells were fixed with ethanol/acetone and $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ was identified with purified Ig K36 mAb.

protein accumulates after Mimosin and APH in a manner similar to that observed after HU. These data suggest that stalled replication forks at the G_1 -S border or in early S phase induce the accumulation of HSAkin17 protein (Fig. 4B).

We asked further if the formation of DSBs after IR, CPT, and VP16 was able to enhance the level of HSAkin17 protein. We showed that irradiation, CPT, or VP16 treatment led to the accumulation of DNA-bound HSAkin17 protein into discrete nuclear foci (Fig. 4, B and C). It was noteworthy that an increase of chromatin-bound RPA70 protein was detected after these treatments in parallel with a decrease of the nucleoplasm-associated RPA70, suggesting a shift in the equilibrium (Fig. 4B). In opposition to Fig. 3, where RKO cells were at confluence before treatment, cells in Fig. 4 were in a slowly proliferating state contributing to an elevated PCNA basal level. In these conditions, we failed to detect significant variation in PCNA in both protein fractions.

We conclude that the inhibition of DNA replication by several types of chemical and physical agents producing DSBs is correlated with increased intranuclear levels of HSAkin17 protein but not of other nuclear proteins like PCNA.

G₁-S Arrest Leads to the Association of HSAkin17 Protein to High Molecular Weight Complexes

We tested whether the dot-like nuclear structures formed by HSAkin17 protein and detected by immunocytochemical staining corresponded to the presence of HSAkin17 protein in discrete high molecular weight complexes that may be detected by biochemical methods. Firstly, we analyzed the molecular mass of purified HSAkin17 protein. The (His)₆-HSAkin17 protein was overexpressed and purified to homogeneity from extracts of baculoviral infected Sf9 cells using metal-affinity and heparin-based chromatography (5). Purified (His)₆-HSAkin17 protein was mainly eluted as a monomer with an apparent

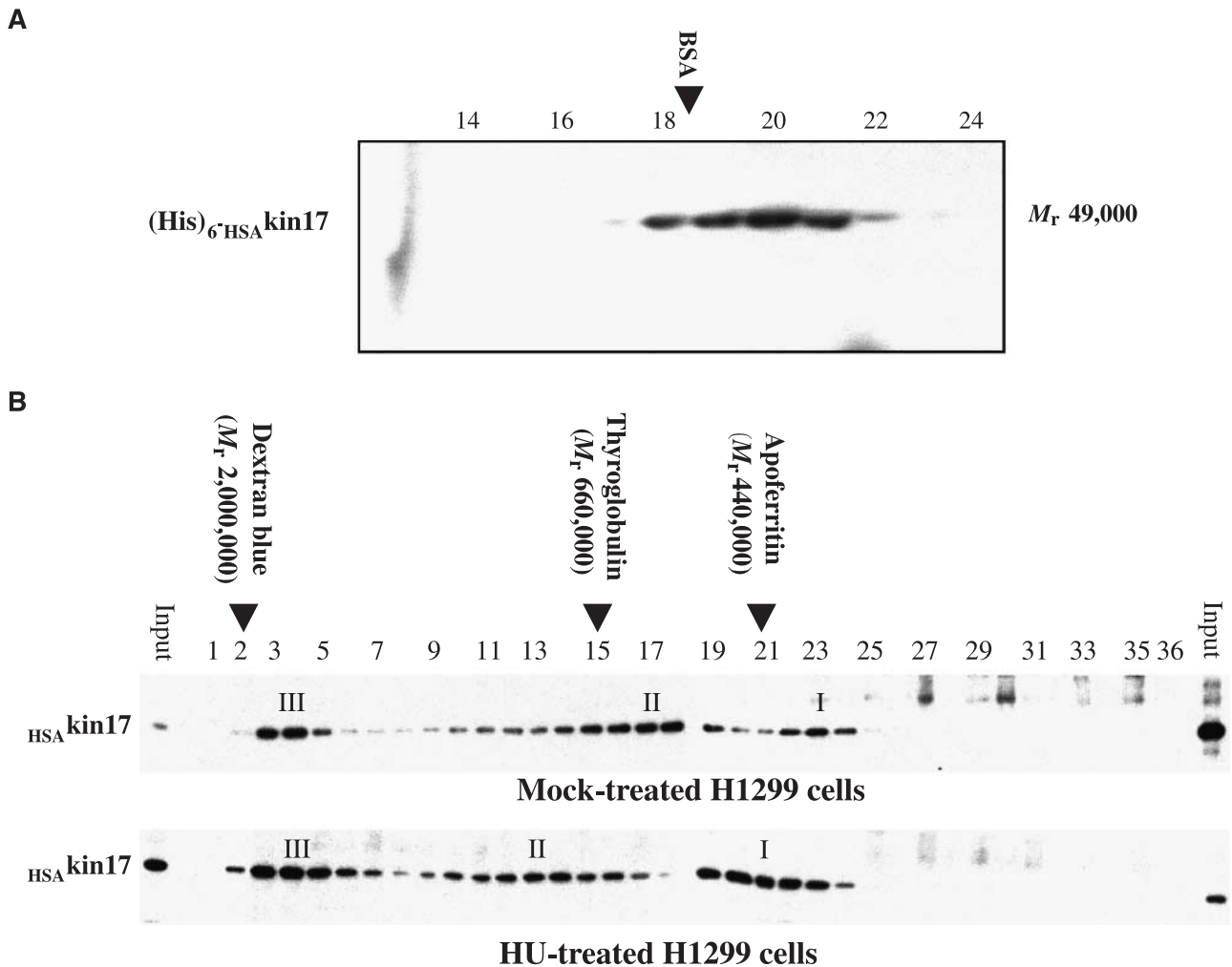


FIGURE 5. Chromatographic separation of endogenous HSAkin17 protein into high molecular weight complexes after HU treatment. **A.** Gel filtration analysis of (His)₆-HSAkin17 protein. Five hundred nanograms of (His)₆-HSAkin17 protein were separated by size exclusion chromatography through a Superdex 200 HR 10/30 column and fractions were analyzed by SDS-PAGE using anti-His monoclonal antibody. The column was calibrated using apoferritin (M_r 440,000), β -amylase (M_r 200,000), aldolase (M_r 158,000), and BSA (M_r 67,000) (data not shown). **B.** H1299 cells were seeded 1 day before treatment and buffer N-soluble proteins were recovered and fractionated through a Superose 6 HR 10/30 column as described in "Materials and Methods." Proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE. The numbers refer to the analyzed column fractions. The arrows above the gel indicate the fraction numbers at which the standards eluted: apoferritin (M_r 440,000); thyroglobulin (M_r 660,000); and dextran blue (M_r 2,000,000).

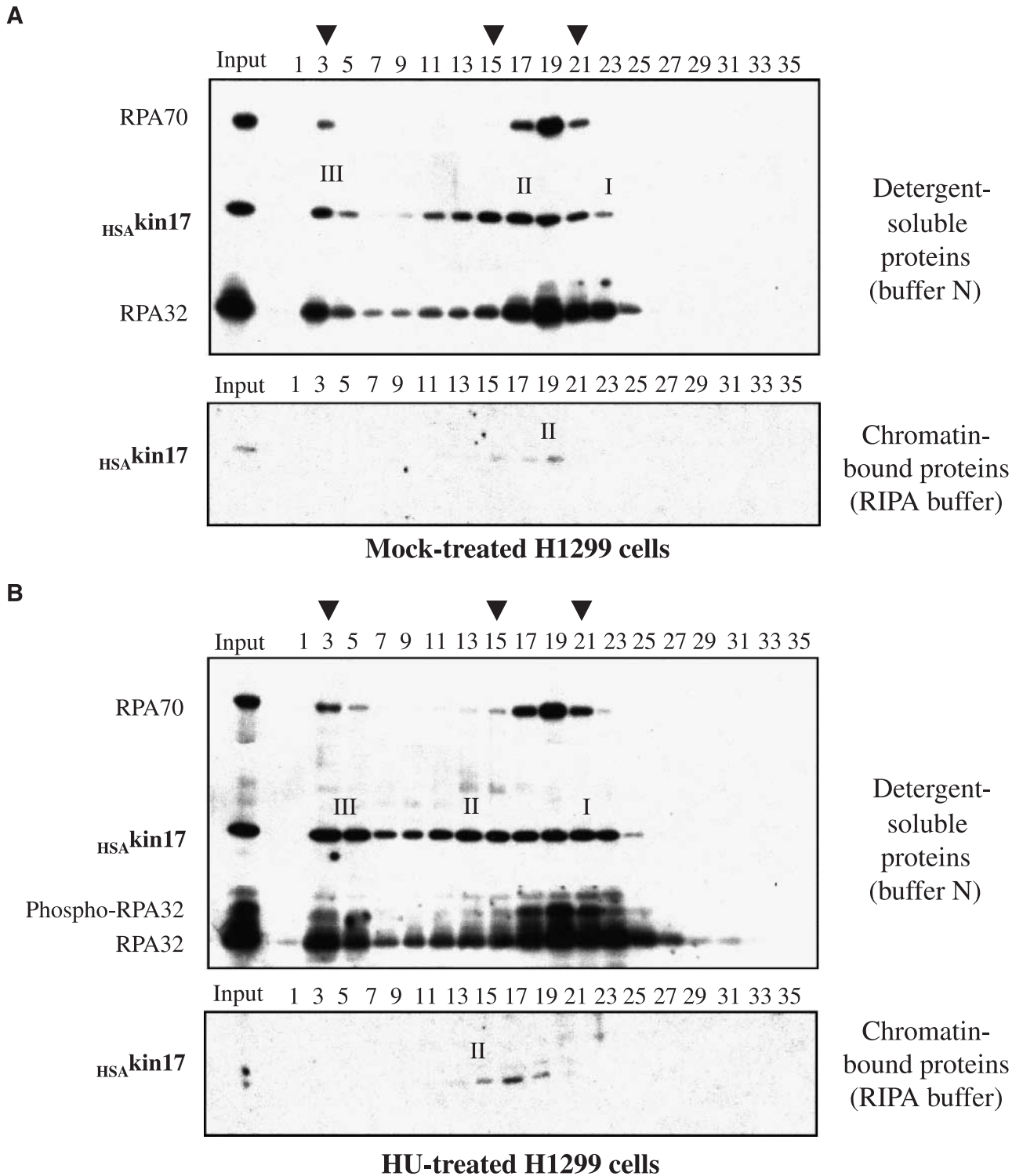


FIGURE 6. Co-elution of HSA kin17 and RPA into high molecular weight complexes after HU treatment. Fractionation of both buffer N-soluble and chromatin-bound proteins from (A) mock-treated H1299 cells or (B) H1299 cells treated with 2 mM HU for 24 h. Legend is the same as in Fig. 5.

molecular weight lower than M_r 67,000 corresponding to BSA (Fig. 5A), as evidenced by gel filtration using a Superdex 200 HR 10/30 column. These data indicate that the purified $(\text{His})_6\text{-HSAkin17}$ has a monomeric structure and behaves as a globular protein.

Secondly, we determined the molecular weight of the endogenous HSAkin17 protein in H1299 cells. Detergent-soluble proteins and chromatin-bound proteins were recovered from either mock-treated or HU-treated H1299 cells and analyzed separately by gel filtration. Under gentle conditions of lysis in buffer N, most of the HSAkin17 and RPA70 protein content was detected as detergent-soluble proteins in the absence of genotoxic injuries (as shown for RKO cells in Fig. 4B). Gel filtration revealed the absence of monomeric HSAkin17 protein in the extracts of H1299 cells with or without treatment (Fig. 5). This result suggested that endogenous HSAkin17 protein was mainly present in huge nuclear complexes. Indeed, HSAkin17 protein was distributed into three protein fractions with molecular masses corresponding to about M_r 400,000, and 600,000 and 1,800,000 named here peaks I, II, and III (Figs. 5B and 6A). Note that HSAkin17 and RPA proteins (both the M_r 70,000 and 32,000 subunits) co-eluted in fraction 19 (Fig. 6A). HSAkin17 and RPA proteins were also co-eluted into very high molecular weight structures of about M_r 1,800,000 (peak III, Fig. 6A).

The three HSAkin17-containing peaks displayed a significant shift toward higher molecular weights in cells presenting a cell cycle arrest at the G_1 -S transition after a 24-h HU treatment (Figs. 5B and 6B, fraction 13). RPA conserved the same expression profile after HU treatment and was eluted in fractions 19–21. Nevertheless, HU treatment led to the concentration of both HSAkin17 and RPA proteins in peak III at roughly M_r 2,000,000 (Fig. 6B, fractions 3–5). It was noteworthy to observe a population of slower migrating RPA32 after HU treatment corresponding to hyperphosphorylated forms. Interestingly, the hyperphosphorylation of RPA32 is a cellular marker for activation of the DNA damage response pathway.

Peak II was clearly detected in fractions of chromatin-bound proteins soluble in RIPA buffer, a relatively stringent buffer that sustains only high-affinity interactions. This peak clearly shifted to higher molecular weights after HU treatment (Fig. 6, A versus B). Under our experimental conditions of protein extraction using RIPA buffer to recover chromatin-bound proteins, we failed to detect RPA. However, each fraction analyzed corresponded to a very low number of cell equivalents (3,000 cells) opening the possibility to be below the detectable threshold. The fact that these peaks were preserved in RIPA buffer suggests strong protein interactions between the different building blocks.

These data indicate that the re-localization of HSAkin17 protein into intranuclear foci after an HU treatment corresponds to a re-distribution of HSAkin17 protein in stable complexes of high molecular weight and suggest that HSAkin17 and RPA are part of a multiprotein complex of M_r 600,000 eluted in the peak II of detergent soluble proteins.

Discussion

The notion that HSAkin17 protein is involved in DNA replication stemmed from the following observations: (a) the

distribution of endogenous HSAkin17 protein in intranuclear dots in proliferating cells resembled those of proteins, such as RPA70, involved in DNA replication (4); (b) endogenous kin17 protein physically interacts with the SV40 large T antigen when this protein is bound to the SV40 DNA origin of replication; (c) both T antigen and human HSAkin17 protein are part of the same high molecular weight multiprotein complex in infected human cells; (d) the overexpression of human HSAkin17 protein *in vivo* or the introduction of increased amounts of HSAkin17 protein in an *in vitro* assay reduced T antigen-dependent DNA replication (5); and (e) RKO cells expressing HSAKIN17 antisense transcripts displayed a premature entry into S phase and an accumulation of cells in early and mid S phase (4). All these data are reinforced by the fact that DSB-generating agents, such as IR, induce the accumulation of chromatin-bound HSAkin17 protein and its re-localization into larger foci in different human cell lines probably at sites of unrepaired DNA damage that may inhibit or slow down the replication process (4, 12).

Replication foci are commonly detected as numerous granules distributed throughout the nucleus as shown by light microscopic analysis (24). The ultrastructural localization of DNA replication sites by means of immunoelectron microscopy reveals replication factories at the periphery of condensed chromatin areas and that the neosynthesized DNA moves rapidly from replication sites toward the interior of condensed chromatin areas (see 25, 26). Nascent DNA, DNA polymerase α , cyclin A, or PCNA are located at the border of condensed chromatin (21, see 26). For the first time, we identified HSAkin17 protein near or at the sites of DNA replication. Almost all of the HSAkin17 foci co-localized with BrdUrd incorporation sites. It is difficult to affirm that HSAkin17 protein is required preferentially during the initiation of DNA replication because newly synthesized DNA moves rapidly toward the interior of condensed chromatin, after 5 min of BrdUrd incorporation. After a period of 1 h, DNA replication in one replication cluster present in a "replication factory" is nearly complete (24). Under these conditions, the co-localization of HSAkin17 with BrdUrd after a pulse of 120 min indicated that either (a) HSAkin17 protein remains associated with sites of newly duplicated DNA, or (b) HSAkin17 re-associated with new replication sites because waves of DNA synthesis consist of different groups of foci activated in turn (26). These data strengthened the notion that endogenous HSAkin17 protein is involved in DNA replication.

While HSAkin17 protein is expressed during the whole cell cycle of asynchronous proliferating cells (unpublished data), the chromatin-bound fraction of HSAkin17 protein increased after treatment that completely abolished DNA replication like Mimosin or HU. Although Mimosin alters nucleotide pool levels *in vivo* inhibiting the elongation step of DNA synthesis, it also inhibits the initiation of DNA replication as well (27). As a consequence, cells were blocked since the late G_1 , before the entry into the S phase. The increase in the chromatin-bound HSAkin17 fraction after Mimosin treatment and 1 h after drug withdrawal suggests its participation during the re-initiation of DNA replication. This observation was confirmed by HU treatment which mainly blocked cells in early S phase. We observed a time-dependent increase of the chromatin-bound HSAkin17 protein content after drug withdrawal when cells

traversed the S phase. If HSAkin17 protein is involved in DNA replication and especially during the early phases of this process, this progressive increase could be required either (a) to prepare the second wave of DNA replication after HU withdrawal, or (b) to avoid a re-entry in S phase before the completion of DNA replication. This expression profile is reminiscent of those observed for other proteins associated with the initiation of DNA replication (6).

Certain inhibitors of DNA replication may trigger the redistribution of DNA ligase I and PCNA from replicative patterns leading to the disassembly of replication factories, such as the topo II inhibitor VP16 (28). Other inhibitors, such as APH (inhibitor of DNA polymerase α and δ), were unable to disperse the enzymes belonging to replication factories. In the particular case of HSAkin17 protein, all the tested drugs interfering with either initiation and/or elongation of DNA replication induced its recruitment to chromatin together with RPA70. This suggests that HSAkin17 and RPA70 proteins remained strongly anchored to chromosomal DNA after genotoxic injuries. In the absence of genotoxic injury, most of the nuclear HSAkin17 and RPA70 proteins are found free in the nucleosol or slightly associated with nuclear structures (buffer N-soluble fraction), whereas only a minor fraction of both proteins is associated with chromatin (buffer N-insoluble fraction). This observation confirms data previously reported for RPA70 (18).

It was noteworthy that since endogenous HSAkin17 protein level has been reported to increase in S-phase cells, APH, VP16, or CPT treatments could indirectly increase the HSAkin17 protein level by increasing the number of cells arrested in S phase. However, HSAkin17 protein was also recruited by other treatments (HU, MIMO, or γ rays), triggering a dramatic decrease of the number of cells in S phase. This observation outlined that the HSAkin17 protein could be required for both DNA replication and repair.

HSAkin17 protein forms nuclear foci in normal proliferating cells as well as in response to aberrant DNA structures including DSBs and stalled replication forks. These dot-like structures are tightly anchored to DNA structures as shown by detergent extraction before cell fixation. This type of distribution is characteristic of proteins involved in DNA metabolism such as PCNA (19, 29). On the other hand, the co-localization of HSAkin17 with BrdUrd might correspond to high molecular weight complexes devoted to either DNA replication or DNA repair. This view is consistent with the biochemical detection of HSAkin17 protein in three peaks of high molecular weight in H1299 cells before and after HU treatment (Fig. 6). Interestingly, HSAkin17 protein co-eluted with RPA in the peak II of M_r 600,000; it is tempting to speculate that HSAkin17 and RPA belong to a same multiprotein complex of M_r 600,000 corresponding to the replication complex as mentioned elsewhere (30). HSAkin17 could also participate in the formation of other complexes displaying different functionalities. The increase in the molecular weight of the three peaks containing HSAkin17 protein after HU-induced G_1 -S arrest is not surprising. Indeed Chiba and Parvin (31) have shown the appearance of a specific complex induced by HU and termed HUIC. Our results suggest that a HU-induced G_1 -S arrest might lead to a molecular remodeling of nuclear complexes containing HSAkin17 protein and other proteins involved in DNA

replication and repair. This idea is also supported by the recent finding that RKO cells overproducing HSAkin17 protein present higher DNA content as judged by flow cytometry analysis (12). Now, the biochemical characterization of peaks I, II, and III will help us to further determine the role of HSAkin17 protein in DNA replication.

Materials and Methods

Cell Cultures

RKO (colorectal carcinoma) and H1299 (human non-small cell lung cancer) were maintained in a DMEM (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) supplemented with 10% FCS, 100 units/ml of penicillin, and 100 $\mu\text{g/ml}$ of streptomycin, under 5% CO_2 .

Cells were seeded 3 or 4 days before treatment. Irradiation was performed using a ^{137}Cs source (IBL 637, CisBio International, Gif sur Yvette, France) with a dose rate of 1.97 Gy/min and chemical treatments were done with either APH, etoposide (VP16), CPT, HU, or Mimo (all from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) at the doses indicated below. Samples were analyzed 24 h later. Experiments were repeated more than five times under different culture conditions.

Indirect Immunofluorescence Staining

Cells were plated at 5,000 cells/ cm^2 on glass coverslips 4 days before treatment. Twenty-four hours later, cells were fixed for 5 min in 70% acetone/30% methanol at -20°C . Alternatively, cells were washed in PBS and extracted with 0.5% Triton X-100 in modified cold cytoskeleton buffer [CSK: 100 mM NaCl/300 mM sucrose/1 mM MgCl_2 /1 mM EGTA in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8)] for 5 min at room temperature. After two washes in PBS, cells were fixed with 4% PFA for 20 min at room temperature, washed with PBS, and treated for 10 min with 0.5% Triton X-100 + 0.5 mM CuSO_4 in PBS min. Coverslips were stored in PBS at 4°C before staining. Primary antibodies were diluted in buffer B (0.5% Tween 20, 12% BSA, 0.036% NaN_3 in PBS) and incubated for 45 min. Cells were stained with the purified Ig K36 anti- HSAkin17 (400 ng/ml). Primary antibodies were revealed with Cy3-conjugated affinity-purified goat anti-mouse IgG (2 $\mu\text{g/ml}$; The Jackson Laboratory, Inc., West Grove, PA). Cells were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; 4 $\mu\text{g/ml}$). Immunofluorescence staining was viewed using a Zeiss Axiophot 2 epifluorescence microscope coupled to a cooled Sensys 1400 camera from Photometrics monitored by the Zeiss KS300 3.0 program. The use of a CCD camera-based imaging system allows high resolution and a wide dynamic range for acquiring and analyzing fluorescent staining. Representative fields for each cell line are presented.

Protein Extraction and Western Blot

RKO cells were seeded at 5,000 cells/ cm^2 4 days before treatment. Cells were treated at about 50% of confluence and 24 h later, cells were trypsinized, counted, and washed in PBS. To discriminate between chromatin-bound proteins versus detergent-soluble proteins, cells were lysed with 100 μl per 10^6 cells of buffer N [50 mM Tris-HCl (pH 7.9)/150 mM NaCl/1% Igepal/1 mM EDTA/protease inhibitor cocktail (complete from Roche, Indianapolis, IN)]. Lysates were maintained on ice

for 30 min. Soluble proteins were recovered after centrifugation ($20,000 \times g$ for 15 min). Remaining pellets (insoluble proteins) were directly denatured with 100 μ l per 10^6 cells of $2 \times$ Laemmli buffer. Both fractions were analyzed by Western blot. Purified IgG K36 and Ig K58 were used at the concentration of 40 ng/ml. Other antibodies used were rabbit polyclonal anti-RPA32 protein (diluted to 1/300; kindly provided by R. Knippers), anti-RPA70 (mAb NA13, 50 μ g/ml; Oncogene Research Products, Calbiochem, Darmstadt, Germany), and anti-PCNA (mAb PC10 diluted to 50 μ g/ml; Novo Castra, Newcastle, United Kingdom).

Gel Filtration Analysis of Endogenous HSAkin17 Protein

Cells were seeded 1 day before treatment and collected 24 h later. After trypsinization and counting, chromatin-bound proteins and detergent-soluble proteins were recovered separately as described above except for chromatin-bound proteins which were resuspended in a RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)/150 mM NaCl/1% Igepal/0.1% SDS/0.1% sodium deoxycholate/protease inhibitor cocktail (*complete* from Roche)]. The equivalent of 5×10^5 cells of both fractions was fractionated by gel filtration through a Superose 6 HR 10/30 column (Smart System, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom) equilibrated in 50 mM Tris (pH 8)/150 mM NaCl. The columns were run at 40 μ l/min at 4°C. We used protein standards analyzed under the same conditions to calibrate the column. Protein fractions (40 μ l) were collected and proteins were denatured in Laemmli sample buffer, boiled for 10 min at 100°C, and analyzed by Western blot.

Purified recombinant (His)₆-HSAkin17 protein was analyzed by gel filtration through a Superdex 200 HR 10/30 column as described (5). Fractions containing (His)₆-kin17 protein were detected by Western blotting with anti-His antibody (Clontech, Palo Alto, CA) and revealed by chemiluminescence.

Flow Cytometry Analysis of BrdUrd Incorporation

Flow cytometry analysis of BrdUrd incorporation was performed as already described (4).

Immunoelectron Microscopy Detection of HSAkin17 and BrdUrd

Fixation and Embedding. Specimens were processed as described elsewhere (21). After pulse-BrdUrd labeling, cells were fixed for 1 h at 4°C with either 4% formaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3), or 1.6% glutaraldehyde (Taab Lab. Equip. Ltd., Reading, United Kingdom) in the same buffer. During fixation, the cells were scraped from the plastic substratum and centrifuged. Pellets were dehydrated in increasing concentrations of methanol and embedded in Lowicryl K4M (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg, Germany) at a low temperature according to Roth (32). Polymerization was carried out for 5 days at -30°C under long wavelength UV light (Phillips fluorescent tubes TL 6W). Ultrathin sections of Lowicryl-embedded material were collected on formvar-carbon-coated gold grids (200 mesh) and stored until use.

Immunogold Labeling. To study in the same cells the respective localizations of the newly replicated DNA with HSAkin17, double labelings were carried out. Before the immunocytochemical procedure, Lowicryl sections of form-

aldehyde-fixed cells were treated with 5 M HCl for 15 min at room temperature, washed with distilled water, and air-dried. Lowicryl thin sections of cells were first hydrolyzed for 15 min over drops of 5 N HCl, rinsed in a jet of distilled water, and air-dried. They were placed for 2 min over drops of BSA (5% in PBS) to prevent background. They were then floated for 1 h, at room temperature, on drops of rat monoclonal anti-BrdUrd (Harlan SERA-LAB LTD., Loughborough, United Kingdom) diluted 1/20 in PBS or over normal rat serum as control, diluted 1/20 in PBS. After three washings on drops of PBS, cell sections were floated on drops of mouse monoclonal anti-HSAkin17 (mab K36 + mab K58) diluted 1/10 in PBS or over normal mouse serum as control diluted 1/10 in PBS. After 15-min washing on three drops of PBS, the grids were incubated for 30 min over drops of a mixture of 1/30 dilution in PBS of goat anti-rat IgG conjugated to gold particles, 10 nm in diameter, and goat anti-mouse IgG conjugated to gold particles, 5 nm in diameter (Biocell Research Laboratories, Cardiff, United Kingdom). After 5-min passages on three drops of PBS, the grids were rapidly rinsed in a jet of distilled water, air-dried, and stained for 10 min with 5% aqueous uranyl acetate. Grids were observed with a Philips 400 transmission electron microscope, at 80 kV, at $\times 8000$ –22,000 magnification.

Acknowledgments

The authors are indebted to Y. Frobert and J. Grassi for advice and support, and to M. Plaisance, P. Lamourette, and M.C. Nevers for their efficient help in producing monoclonal antibodies. We particularly thank D. Rouillard (Institut Curie) for kindly performing the flow cytometry analysis of BrdUrd-labeled cells. We are grateful to Dr. R. Knippers for providing polyclonal antibody against RPA32.

References

- Hozak, P., Hassan, A. B., Jackson, D. A., and Cook, P. R. Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell*, 73: 361–373, 1993.
- Frouin, I., Montecucco, A., Biamonti, G., Hubscher, U., Spadari, S., and Maga, G. Cell cycle-dependent dynamic association of cyclin/Cdk complexes with human DNA replication proteins. *EMBO J.*, 21: 2485–2495, 2002.
- Fuss, J. and Linn, S. Human DNA polymerase epsilon colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase. *J. Biol. Chem.*, 277: 8658–8666, 2002.
- Biard, D. S. F., Miccoli, L., Despras, E., Frobert, Y., Créminon, C., and Angulo, J. F. Ionizing radiation triggers chromatin-bound HSAkin17 complex formation in human cells. *J. Biol. Chem.*, 277: 19156–19165, 2002.
- Miccoli, L., Biard, D. S. F., Créminon, C., and Angulo, J. F. Human kin17 protein directly interacts with the SV40 large T antigen and inhibits DNA replication. *Cancer Res.*, 62: 5425–5435, 2002.
- Ritzi, M., Baack, M., Musahl, C., Romanowski, P., Laskey, R. A., and Knippers, R. Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin. *J. Biol. Chem.*, 273: 24543–24549, 1998.
- Göhring, F., Schwab, B. L., Nicotera, P., Leist, M., and Fackelmayer, F. O. The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown. *EMBO J.*, 16: 7361–7371, 1997.
- Angulo, J. F., Moreau, P. L., Maunoury, R., Laporte, J., Hill, A. M., Bertolotti, R., and Devoret, R. Kin, a mammalian nuclear protein immunologically related to *E. coli* RecA protein. *Mutat. Res.*, 217: 123–134, 1989.
- Angulo, J. F., Rouer, E., Mazin, A., Mattei, M. C., Tissier, A., Horellou, P., Benarous, R., and Devoret, R. Identification and expression of the cDNA of Kin17, a zinc finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, 19: 5117–5123, 1991.
- Mazin, A., Milot, E., Devoret, R., and Chartrand, P. Kin17, a mouse nuclear protein, binds to bent DNA fragments that are found at illegitimate recombination junctions in mammalian cells. *Mol. Gen. Genet.*, 244: 435–438, 1994.
- Mazin, A., Timchenko, T., Mènisser-de Murcia, J., Schreiber, V., Angulo, J. F., de Murcia, G., and Devoret, R. Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4335–4341, 1994.

12. Despras, E., Miccoli, L., Créminon, C., Rouillard, D., Angulo, J. F., and Biard, D. S. F. Depletion of kin17, a human DNA-replication protein, increases the radiosensitivity of RKO cells. *Radiat. Res.*, in press, 2003.
13. Masson, C., Mena, F., Pinon-Lataillade, G., Frobort, Y., Chevillard, S., Radicella, J. P., Sarasin, A., and Angulo, J. F. Global genome repair is required to activate KIN17, a UVC-responsive gene involved in DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *100*: 616–621, 2003.
14. Kannouche, P., Mauffrey, P., Pinon-Lataillade, G., Mattei, M. G., Sarasin, A., Daya-Grosjean, L., and Angulo, J. F. Molecular cloning and characterization of the human KIN17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans. *Carcinogenesis*, *21*: 1701–1710, 2000.
15. Blattner, C., Kannouche, P., Litfin, M., Bender, K., Rahmsdorf, H. J., Angulo, J. F., and Herrlich, P. UV-induced stabilization of *c-fos* and other short-lived mRNAs. *Mol. Cell. Biol.*, *20*: 3616–3625, 2000.
16. Wakasugi, M. and Sancar, A. Order of assembly of human DNA repair excision nuclease. *J. Biol. Chem.*, *274*: 18759–18768, 1999.
17. Sokhansanj, B. A., Rodrigue, G. R., Fitch, J. P., and Wilson, D. M. r. A quantitative model of human DNA base excision repair. I. Mechanistic insights. *Nucleic Acids Res.*, *30*: 1817–1825, 2002.
18. Treuner, K., Eckerich, C., and Knippers, R. Chromatin association of replication protein A. *J. Biol. Chem.*, *273*: 31744–31750, 1998.
19. Balajee, A. S. and Geard, C. R. Chromatin-bound PCNA complex formation triggered by DNA damage occurs independent of the ATM gene product in human cells. *Nucleic Acids Res.*, *29*: 1341–1351, 2001.
20. Dimitrova, D. S., Todorov, I. T., Melendy, T., and Gilbert, D. M. Mcm2, but not RPA, is a component of the mammalian early G1-phase prereplication complex. *J. Cell Biol.*, *146*: 709–722, 1999.
21. Sobezak-Thepot, J., Harper, F., Florentin, Y., Zindy, F., Brechot, C., and Puvion, E. Localization of cyclin A at the sites of cellular DNA replication. *Exp. Cell Res.*, *206*: 43–48, 1993.
22. Jaunin, F., Visser, A. E., Cmarko, D., Aten, J. A., and Fakan, S. A new immunocytochemical technique for ultrastructural analysis of DNA replication in proliferating cells after application of two halogenated deoxyuridines. *J. Histochem. Cytochem.*, *46*: 1203–1209, 1998.
23. Krude, T. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp. Cell Res.*, *247*: 148–159, 1999.
24. Manders, E. M., Stap, J., Brakenhoff, G. J., van Driel, R., and Aten, J. A. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Sci.*, *103*: 857–862, 1992.
25. Visser, A. E., Jaunin, F., Fakan, S., and Aten, J. A. High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J. Cell Sci.*, *113*: 2585–2593, 2000.
26. Jaunin, F. and Fakan, S. DNA replication and nuclear architecture. *J. Cell. Biochem.*, *85*: 1–9, 2002.
27. Tsvetkov, L. M., Russev, G. C., and Anachkova, B. B. Effect of mimosine on DNA synthesis in mammalian cells. *Cancer Res.*, *57*: 2252–2255, 1997.
28. Montecucco, A., Rossi, R., Ferrari, G., Scovassi, A. I., Prosperi, E., and Biamonti, G. Etoposide induces the dispersal of DNA ligase I from replication factories. *Mol. Biol. Cell*, *12*: 2109–2118, 2001.
29. Andegeko, Y., Moyal, L., Mittelman, L., Tsarfaty, I., Shiloh, Y., and Rotman, G. Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.*, *276*: 38224–38230, 2001.
30. Jiang, H. Y., Hickey, R. J., Abdel-Aziz, W., Tom, T. D., Wills, P. W., Liu, J., and Malkas, L. H. Human cell DNA replication is mediated by a discrete multiprotein complex. *J. Cell. Biochem.*, *85*: 762–774, 2002.
31. Chiba, N. and Parvin, J. D. Redistribution of BRCA1 among four different protein complexes following replication blockage. *J. Biol. Chem.*, *276*: 38549–38554, 2001.
32. Roth, J. Post-embedding labeling on Lowicryl K4M tissue sections: detection and modification of cellular components. *In*: A. M. Tartakoff (ed.), *Methods in Cell Biology*, pp. 513–551, New York: Academic Press, 1989.

Résultats complémentaires obtenus au laboratoire

Différents résultats obtenus au laboratoire au cours de ma thèse ont permis de préciser les interactions de la protéine HSAkin17 avec les structures nucléaires et de confirmer son implication dans la réplication de l'ADN.

1. La protéine HSAkin17 est différentiellement associée à la chromatine et à la matrice nucléaire en l'absence et en présence de dommages de l'ADN.

Dans des cellules HeLa asynchrones, la protéine HSAkin17 s'associe à la fois avec la chromatine et avec des structures nucléaires non chromatiniennes (matrice nucléaire). Le fractionnement de cellules HeLa arrêtées dans une phase du cycle cellulaire montre que la protéine HSAkin17 s'associe préférentiellement avec des structures nucléaires non chromatiniennes au niveau de la transition G1/S et pendant la phase S. Cependant, le traitement par un agent méthylant (N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) durant la phase S entraîne une relocalisation de la protéine HSAkin17 sur la chromatine (Miccoli et al., 2003). Ainsi, en temps normal, la protéine HSAkin17 associée à la matrice nucléaire pourrait participer à la réplication de l'ADN. En présence de dommages de l'ADN, elle pourrait être recrutée sur la chromatine afin d'assurer la réplication en dépit des dommages, de participer à la réparation ou d'assurer le couplage entre réplication et réparation.

2. La protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ appartient au complexe de réplication et joue un rôle dans la réplication de l'ADN.

L'addition de protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ purifiée dans des extraits de cellules HeLa ou l'utilisation d'extraits de cellules immortalisées HEK 293 sur-exprimant la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ inhibe de moitié la réplication d'un plasmide SV-40 par rapport au contrôle dans un test *in vitro* (Miccoli et al., 2002). Ceci précise les résultats obtenus précédemment avec la protéine $_{\text{MMU}}\text{kin17}$ (Kannouche and Angulo, 1999). La protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ co-précipite avec l'antigène T (Ag T), protéine virale indispensable à la réplication du virus SV-40. Cette interaction s'effectue au niveau de la région T2 de l'extrémité N-terminale de l'Ag T (acides aminés 168 à 383), région impliquée dans l'interaction avec l'ADN, p53 et la polymérase α (pol α). Ceci suggère un rôle direct de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ dans la réplication dépendant de l'Ag T.

Dans la lignée HeLa et les cellules de singe CV-1, la protéine $_{\text{kin17}}$ s'associe préférentiellement à des fragments d'ADN génomique contenant des origines de réplication (Miccoli et al., 2005). De plus, deux méthodes de purification ont permis d'identifier la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ comme un composant du complexe de réplication de l'ADN. La déplétion de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ du complexe purifié entraîne une réduction de son activité *in vitro*. Ces résultats démontrent l'implication directe de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ dans la réplication de l'ADN (Miccoli et al., 2005). L'association avec les origines de réplication en G1/S et tout au long de la phase S suggère que la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ joue un rôle dès l'initiation de la réplication et qu'elle pourrait ensuite participer à la phase d'élongation ou contrôler que la réplication n'est pas initiée plus d'une fois par cycle au niveau des origines.

Article IV

L'interférence ARN à long terme

La protéine *HSAkin17* est impliquée dans différents processus du métabolisme de l'ADN, dont la réplication, et dans la réponse cellulaire à des agents génotoxiques aux mécanismes d'action variés. En particulier, les travaux déjà effectués au laboratoire sur l'implication de la protéine *HSAkin17* dans la réponse aux UV et ses relations avec les protéines XPA et XPC (Masson et al., 2003) ainsi que les résultats obtenus lors de ma thèse sur la réponse aux DSB, nous ont conduit à nous intéresser au NER et au NHEJ.

Afin d'étudier, dans un modèle syngénique, les relations éventuelles entre ces mécanismes de réparation de l'ADN et l'implication éventuelle de la protéine *HSAkin17*, nous avons choisi de tirer partie des opportunités offertes par l'interférence ARN (ARNi), une technique permettant de réduire le niveau d'expression d'un gène.

1. L'interférence ARN comme outil biologique

L'ARNi est un processus biologique par lequel l'introduction ou la production de séquences d'ARN double-brin dans des cellules entraîne l'extinction ou la réduction de l'expression d'un gène cible. Il s'agit d'un mécanisme post-transcriptionnel de régulation des gènes, hautement coordonné et spécifique d'une séquence.

Les ARN non codant de petite taille (siRNA de l'anglais *small interfering RNA* et miRNA de l'anglais *micro RNA*) jouent un rôle essentiel *in vivo* dans la régulation épigénétique, la dynamique des chromosomes, la compensation génique des gènes portés par les chromosomes sexuels ou les phénomènes interférant avec la différenciation cellulaire et le développement des organismes. Cette voie métabolique est très conservée au cours de l'évolution. Chez les

Résultats

mammifères, seule la voie prenant en charge les miRNA est naturellement active. Mais la voie siRNA peut être réactivée par l'introduction d'ARN double-brin.

La découverte de l'ARNi a été le fruit de résultats inattendus obtenus par différentes équipes travaillant sur les plantes (pétunias) (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990), les moisissures (*Neurospora crassa*) (Cogoni and Macino, 1997) ou les nématodes (*C. elegans*) (Fire et al., 1998). Cette dernière équipe a montré que l'injection des deux brins d'ARN est plus efficace que l'injection du brin sens ou antisens seul pour l'extinction du gène cible. L'extinction par des ARN double-brin est hautement spécifique et appartient à un mécanisme complexe de régulation. Ce phénomène a été appelé « *RNA interference* ».

2. Mécanismes moléculaires de l'interférence ARN

A) Le complexe RISC

L'effecteur de l'ARNi est le complexe nucléoprotéique RISC (de l'anglais *RNA-induced silencing complex*). Chez l'homme, le complexe RISC minimal est constitué des protéines Dicer (RNase de type III), TRBP (protéine de fixation aux ARN double-brin) et Argonaute2 (nucléase Ago2) (Gregory et al., 2005). La nucléase Dicer comprend un domaine hélicase en N-terminal, deux domaines RNase III en C-terminal et des motifs de fixation à l'ARN double-brin.

B) miRNA et siRNA

Les miRNA constituent une grande famille d'ARN endogènes de petite taille qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes. Ils sont impliqués dans la régulation de processus clés comme le développement, la symétrie cellulaire, la prolifération ou dans certaines maladies. Ils sont codés par le génome d'un grand nombre d'organismes, depuis les virus, les plantes jusqu'aux mammifères (He and Hannon, 2004; Pfeffer et al.,

Résultats

2004). Leur synthèse se fait en deux étapes à partir de longs ARN primaires polyadénylés (pri-miRNA) transcrits par l'ARN pol II. Les pri-miRNA sont pris en charge dans le noyau par un complexe contenant l'enzyme Drosha, une RNase de type III comme Dicer. Cela conduit à la formation de précurseurs (pré-miRNA) de 70 à 90 nucléotides portant deux nucléotides non appariés en 3', ce qui constitue un signal d'exportation cytoplasmique (Yi et al., 2003). Ces structures en épingles à cheveux sont alors clivées par Dicer pour produire les miRNA.

Les siRNA sont générés par la protéine Dicer dans le cytoplasme à partir d'ARN double-brin d'origine endogène, virale ou expérimentale. Ce sont des fragments de 21 nucléotides ayant en moyenne deux nucléotides non appariés aux extrémités 3'.

C) Mode d'action des siRNA et des miRNA

Les siRNA et les miRNA sont désappariés en deux brins d'ARN par la fonction hélicase du complexe RISC, donnant lieu à des brins *antisens* appelés « guides » et des brins *sens* appelés « passagers ». Chaque complexe RISC porte un seul des deux brins. Les brins passagers sont dégradés par Dicer. Seuls les brins guides assurent la reconnaissance de l'ARNm cible par complémentarité. Les siRNA reconnaissent parfaitement leur cible et ils entraînent une dégradation de l'ARNm cible par le complexe RISC. Le clivage de l'ARNm cible est assuré par la nucléase Ago2. Dans la plupart des cas, les miRNA s'associent de façon imparfaite à la région non traduite de l'ARNm cible ce qui conduit à un blocage de la traduction (Figure 13). Dans les deux cas, ceci se solde par une diminution plus ou moins importante de l'expression du gène cible. Cette régulation négative de l'expression des gènes a été appelée *knock-down* (KD) par analogie avec l'approche *knock-out* (KO) développée chez la souris où la perte des deux allèles d'un gène entraîne la disparition totale de la protéine correspondante.

Résultats

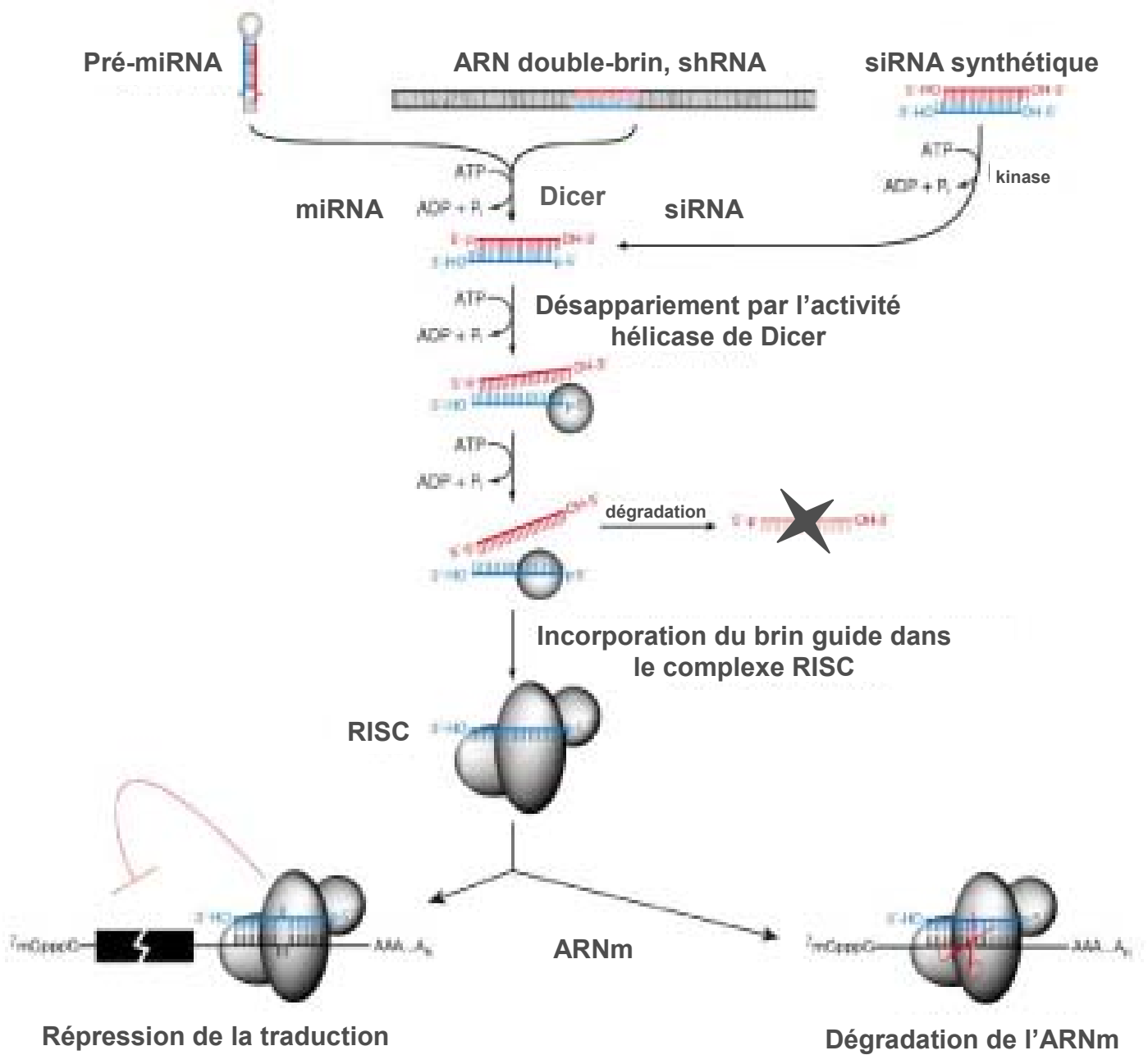


Figure 13: Mécanismes de l'interférence ARN. Les pré-miRNA, les ARN double-brin ou les shRNA sont pris en charge par la protéine Dicer pour donner des miRNA et des siRNA. Les siRNA peuvent être d'origine exogène (siRNA synthétiques). L'activité hélicase de Dicer désapparie les deux brins des miRNA ou siRNA. Le brin sens est dégradé alors que le brin complémentaire assemblé à RISC assure la reconnaissance de l'ARNm cible. Les miRNA reconnaissent imparfaitement l'ARNm et conduisent à la répression de la traduction (à gauche). Les siRNA reconnaissent parfaitement leur cible et entraînent sa dégradation par RISC (à droite) (d'après Schwarz et al. 2003).

3. Introduction d'ARN double-brin dans des cellules de mammifères à des fins expérimentales

Les premiers essais pour réactiver la voie siRNA dans les cellules de mammifères ont été des échecs. En effet, l'introduction d'ARN double-brin de plus de 30 nucléotides active une réponse antivirale qui mène à la dégradation non spécifique des transcrits d'ARN et à une extinction générale de la traduction dans les cellules hôtes. Ces effets non spécifiques sont dus à l'activation de 2 enzymes de la réponse antivirale à l'interféron : (i) la PKR (protéine kinase dépendant des ARN double-brin), laquelle sous sa forme active phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2a et stoppe la synthèse protéique, et (ii) la protéine OAS (2', 5' oligoadénylate synthétase) qui synthétise une molécule activant la RNase L, une enzyme non spécifique qui dégrade tous les ARNm.

En 2001, Tuschl et collaborateurs ont démontré que des ARN double-brin de 21 à 23 nucléotides activent efficacement l'ARNi dans des lysats de drosophile (Elbashir et al., 2001b). De plus, ces fragments obtenus par synthèse chimique suppriment spécifiquement l'expression de gènes endogènes et exogènes dans différentes lignées cellulaires humaines, comme HEK 293 et HeLa, sans déclencher la réponse à l'interféron (Elbashir et al., 2001a). Ces auteurs décrivent pour la première fois des critères de design pour la synthèse *in vitro* de siRNA de 21 nucléotides. D'autres équipes ont confirmé et étendu ces travaux en démontrant que des siRNA synthétiques et identiques en taille peuvent induire une extinction spécifique d'un gène chez l'homme, la souris et *C. elegans* (Caplen et al., 2001).

4. Structures shRNA et vecteurs d'expression

L'introduction de siRNA synthétiques dans des cellules de mammifères ne permet cependant qu'une extinction transitoire du gène cible. En 2002, l'équipe de Brummelkamp et d'Agami a développé le premier vecteur d'expression permettant de produire *in situ* des séquences siRNA (Brummelkamp et al., 2002). Le plasmide pSUPER porte le promoteur H1, reconnu par l'ARN polymérase III, qui contrôle la transcription d'une courte séquence dite shRNA (de l'anglais *short hairpin RNA*). La partie codant le shRNA est constituée d'une séquence de 19 nucléotides et de sa séquence complémentaire en position inverse, séparées par une courte séquence (TTCAAGAGA). Les séquences complémentaires s'apparient dans le transcrit pour former une structure en épingle à cheveux. L'enzyme Dicer clive ces shRNA pour produire les siRNA. Ce vecteur s'est avéré efficace dans l'extinction à court terme d'un gène endogène (*p53*) et d'un transgène (*GFP*). En parallèle, des vecteurs viraux, essentiellement dérivés de l'adénovirus ou des lentivirus (rétrovirus provenant du HIV1) ont été développés pour imposer une ARNi dans des cellules difficilement transfectables ou dans des approches chez l'animal. Cependant, des considérations de sécurité et d'éthique peuvent limiter ce type d'approche.

Récemment, une équipe a introduit une séquence codant un shRNA dans la séquence d'un précurseur de miRNA (séquence hybride shRNA-mir) (Zeng and Cullen, 2005). Cette approche serait *a priori* plus efficace que l'approche classique en transitoire. De plus, les séquences shRNA-mir peuvent être placées sous le contrôle de promoteurs dépendant de l'ARN pol II, comme le promoteur CMV. Ces travaux ont conduit à l'élaboration de bibliothèques criblant une grande partie du génome (RNAi codex ; environ 28 000 gènes humains ciblés et 25 000 gènes de souris) (Olson et al., 2006).

5. Design des séquences shRNA

Les premières règles de design des séquences siRNA formulées par Tuschl et al. sont encore très empiriques (Elbashir et al., 2001c). Puisque les ARNm sont hautement structurés ou liés à des protéines régulatrices, il est nécessaire de sélectionner des séquences cibles dans différentes positions le long de la séquence de l'ARNm. Les deux brins d'un siRNA ne sont pas incorporés de façon semblable dans le complexe RISC. L'asymétrie thermodynamique est donc un facteur important (Schwarz et al., 2003). Afin de favoriser l'incorporation du brin guide dans le complexe RISC, son extrémité 5' doit avoir une énergie plus faible que son extrémité 3' ($\Delta G 5' < \Delta G 3'$ d'au moins 1 kcal/mol) (Khvorova et al., 2003).

En compilant de nombreux résultats expérimentaux, Ui-Tei et collaborateurs ont abouti aux règles suivantes (Ui-Tei et al., 2004) : (i) un A ou un U à l'extrémité 5' du brin *antisens* ; (ii) un G ou un C à l'extrémité 5' du brin *sens* ; (iii) une région riche en AU (5 A/U sur 7 nucléotides par exemple) dans l'extrémité 5' du brin *antisens* ; (iv) une absence de fragment riche en GC supérieur à 9 nucléotides de long. Depuis, un très grand nombre d'algorithmes sont disponibles, certains en libre accès comme celui développé par l'équipe de Chalk et disponible sur le site Internet <http://sirna.cgb.ki.se/> (Chalk et al., 2005). Lorsque les séquences ont été choisies, il convient de vérifier qu'elles sont bien spécifiques du gène cible par une recherche d'homologie dans les banques d'ADNc (BLAST).

Une fois synthétisés, les shRNA sont introduits dans un vecteur d'expression et transfectés dans des cellules en culture. Leur efficacité est confirmée par la diminution de l'ARNm cible (RT-PCR, *northern blot*) et/ou de la protéine correspondante (marquages immunocytochimiques, *Western blot*).

Article IV

Développement de nouveaux vecteurs dérivés du virus d'Epstein Barr pour l'expression stable de petits ARN interférents afin de mimer des syndromes humains: application à l'extinction de gènes du NER. D.S.F. Biard, E. Despras, A.

Sarasin and J.F. Angulo. Mol. Cancer Res. 3, 519–529. 2005.

Les vecteurs non viraux utilisés jusqu'au début de notre étude pour l'expression de séquences siRNA étaient majoritairement des vecteurs intégratifs. L'utilisation de ce type de vecteurs soulèvent deux difficultés : l'inactivation par perte de la cassette siRNA lors de l'intégration et la saturation la machinerie d'ARNi causée par la présence d'un trop grand nombre de copies par cellule. Afin d'obtenir des clones exprimant de manière stable des séquences siRNA, nous avons choisi d'introduire des séquences shRNA dans des plasmides réplicatifs dérivés du virus d'Epstein-Barr (pEBV). Ces plasmides contiennent l'origine de répllication du virus EBV (séquences FR et DYAD) ainsi que la séquence codant la protéine virale EBNA-1. Ils possèdent la particularité de se répliquer au même rythme que le génome (Aiyar et al., 1998), ce qui permet d'éviter un trop grand nombre de copies par cellule. De plus, ils sont maintenus dans le noyau sous forme épisomale en s'ancrant sur les chromosomes grâce à la protéine EBNA-1 (Marechal et al., 1999).

Dans un premier temps, nous avons ciblé les protéines $_{HSA}kin17$, XPA et XPC. La réduction de l'expression des protéines XPA et XPC par des vecteurs pEBV-siRNA permet de mimer un phénotype XP dans les cellules HeLa et d'en étudier les conséquences en s'affranchissant de la variabilité de fond génétique des cellules dérivées de patients.

1. Les vecteurs pEBV-siRNA permettent d'obtenir une réduction spécifique, importante et à long terme de l'expression du gène cible.

L'utilisation de vecteurs pEBV permet d'obtenir plus aisément des clones présentant un niveau très faible de la protéine ciblée que des vecteurs intégratifs. Les clones obtenus, désignés par l'exposant KD (de l'anglais *knock-down*), peuvent être maintenus en culture plus de 450 jours après transfection, en présence d'hygromycine B. Nous avons créé un vecteur contrôle en introduisant une séquence shRNA présentant des mésappariements, et donc inefficace, dans un vecteur pEBV (cellules « contrôle » BD650).

Les vecteurs pEBV offrent un bon compromis à la transfection par des séquences siRNA synthétiques, onéreuse et à court terme, et évitent l'utilisation de virus et les contraintes de sécurité associées.

2. La réduction de l'expression des gènes *XPA* et *XPC* par des vecteurs pEBV-siRNA permet d'établir un phénotype similaire à celui des cellules XP dans la lignée HeLa.

La réduction de l'expression des gènes *XPA* et *XPC* dans les cellules HeLa (clones XPA^{KD} et XPC^{KD}) entraîne une augmentation importante de la sensibilité aux UVC et une réduction de la synthèse non programmée de l'ADN (UDS). Ceci est caractéristique des cellules de patients atteints de *xeroderma pigmentosum*. Il est intéressant de noter que les cellules XPC^{KD} sont plus sensibles aux UVC que les cellules XPA^{KD} . Le blocage du cycle cellulaire consécutif à une exposition aux UVC est également altéré puisque les cellules « contrôle » sont arrêtées en phase S/G2 alors que les cellules XPA^{KD} et XPC^{KD} sont bloquées en phase G1/S.

3. La réduction de la quantité de protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ affecte la croissance cellulaire et la survie après irradiation aux UVC.

Le déficit de protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ (clones KIN17^{KD}), comme celui de protéine XPC, affecte fortement la croissance cellulaire dans les premières semaines suivant la transfection du vecteur pEBV-siRNA. La réduction du niveau de protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ entraîne une sensibilisation modérée aux UVC mise en évidence par des expériences de croissance clonogénique. De plus, la mort cellulaire est 5 fois plus importante que dans les cellules « contrôle » 20 h après irradiation à 15 J/m^2 . Cette augmentation est comparable à ce qui est observé dans les cellules XPA^{KD} .

4. Les vecteurs pEBV-siRNA sont maintenus sous forme épisomale plusieurs mois après transfection.

Les vecteurs pEBV-siRNA restent épisomaux plusieurs mois après transfection dans les cellules XPA^{KD} et XPC^{KD} . L'arrêt de la sélection à l'hygromycine B entraîne la perte des vecteurs et la restauration de l'expression des protéines XPA et XPC.

Cette caractéristique des vecteurs pEBV-siRNA est particulièrement intéressante puisqu'elle permet d'étudier les conséquences de la réversion du phénotype instauré par l'ARNi.

5. La réversion du phénotype XP est partielle dans les cellules XPC^{KD} après la perte du vecteur pEBV-siRNA.

En absence d'hygromycine B, les cellules XPA^{KD} retrouvent une sensibilité normale aux UVC et présentent un blocage en phase S/G2 du cycle cellulaire après exposition aux UVC, comme les cellules « contrôle ». Les cellules XPC^{KD} restent significativement sensibles aux UVC, malgré la restauration d'un niveau normal de protéine XPC. Elles conservent en outre

Résultats

un blocage en phase G1/S. La restauration de l'expression du gène *XPC* consécutive à la perte du vecteur pEBV-siRNA ne suffit pas à reverser le phénotype XP des cellules *XPC*^{KD}.

Hypothèse :

L'utilisation de vecteurs pEBV-siRNA permet de comparer la contribution relative des protéines XPA et XPC à la survie cellulaire après exposition aux UV dans un contexte syngénique. Les cellules *XPC*^{KD} sont plus sensibles aux UVC que les cellules *XPA*^{KD} dans un fond génétique HeLa et conservent cette sensibilité malgré la ré-expression de la protéine XPC. La perte de la protéine XPC pourrait donc entraîner l'apparition de dommages irréversibles. Nous émettons l'hypothèse que la protéine XPC pourrait jouer un rôle plus vaste dans la réparation de l'ADN que dans l'étape de reconnaissance des lésions de l'ADN du NER.

Development of New EBV-Based Vectors for Stable Expression of Small Interfering RNA to Mimick Human Syndromes: Application to *NER* Gene Silencing

Denis S.F. Biard,¹ Emmanuelle Despras,¹ Alain Sarasin,² and Jaime F. Angulo¹

¹Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Département de Radiobiologie et de Radiopathologie, Direction des Sciences du Vivant, Fontenay-aux-Roses, France and ²Laboratory of Genetic Instability and Cancer, Centre National de la Recherche Scientifique UPR2169, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Abstract

We developed and characterized replicative small interfering RNA (siRNA) vectors for efficient, specific, and long-term gene silencing in human cells. We created stable XPA^{KD} and XPC^{KD} (knockdown) syngeneic cell lines to mimic human cancer-prone syndromes. We also silenced *HSAKIN17*. Several clones displaying undetectable protein levels of XPA, XPC, or *HSAkin17* were grown for more than 300 days. This stability of gene silencing over several months of culture allows us to assess the specific involvement of these proteins in UVC sensitivity in syngeneic cells. Unlike XPA, *HSAKIN17*, and XPC gene silencing dramatically impeded HeLa cell growth for several weeks after transfection. As expected, XPA^{KD} and XPC^{KD} HeLa cells were highly UVC sensitive. They presented an impaired unscheduled DNA synthesis after UVC irradiation. Interestingly, XPC^{KD} HeLa clones were more sensitive to UVC than their XPA^{KD} or *KIN17*^{KD} counterparts. Hygromycin B withdrawal led to the total disappearance of EBV vectors and the resumption of normal XPA or XPC protein levels. Whereas reverted XPA^{KD} cells recovered a normal UVC sensitivity, XPC^{KD} cells remained highly sensitive, suggestive of irreversible damage following long-term XPC silencing. Our results show that in HeLa cells, *HSAkin17* participates indirectly in early events following UVC irradiation, and XPC deficiency strongly affects cell physiology and contributes to UVC sensitivity to a greater extent than does XPA. EBV-based siRNA vectors improve the interest of siRNA by permitting long-term gene silencing without the safety concerns inherent in viral-based siRNA vehicles. (Mol Cancer Res 2005;3(9):519–29)

Introduction

Nucleotide excision repair (NER) is a versatile DNA repair pathway capable of removing a wide variety of helix-distorting base lesions, such as UV-induced pyrimidine dimers as well as chemically induced intrastrand cross-links and bulky adducts. Two distinct subpathways have been identified in the mammalian NER system: transcription-coupled repair, which is specialized to eliminate transcription-blocking lesions on the DNA strand of active genes, and the global genome repair, which acts on DNA damage across the whole genome, including the transcribed strand of active genes at least for some lesions (1, 2). Impaired NER activity affecting either transcription-coupled repair or global genome repair, or both, is associated with several hereditary human disorders, including xeroderma pigmentosum. Xeroderma pigmentosum is a rare, photosensitive, and cancer-prone syndrome with recessive and autosomal inheritance. Two forms of xeroderma pigmentosum exist: a “classic” form and a “variant” form (XP-V). XP-V cells are proficient in NER but are impaired in lesion bypass associated with DNA replication on damaged templates. XP-V cells display a mutated pol η gene encoding a translesional polymerase. Cells from classic xeroderma pigmentosum fall into seven complementation groups (named XP-A to XP-G) where one mutated xeroderma pigmentosum protein hampers one step of the NER process. Noteworthy, mutation of one *XP* gene induces a variable deficiency in NER. Most *XP* genes are implicated in both the transcription-coupled repair and global genome repair subpathways, except for XPC which is only deficient in the global genome repair (3).

Transcription-coupled repair and global genome repair differ in the mechanism of DNA damage recognition. transcription-coupled repair is initiated by the blockage of RNA polymerase II by a lesion. In global genome repair, the recognition of the distortion is done by XPC-hHR23B, a global initiator in repair, or the dimer DDB1/DDB2 (XPE group; refs. 4, 5). XPA in conjunction with replication protein A may constitute a repair mediator that monitors DNA bending and unwinding to verify the damage-specific localization of repair complexes or control their correct three-dimensional assembly (6, 7). After damage recognition, which depends on each subpathway, these two DNA repair mechanisms share common steps. The DNA duplex around the lesion is locally unwound by XPB and XPD helicases associated with the transcription factor TFIIH and, at least,

Received 4/13/05; revised 8/1/05; accepted 8/1/05.

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.

Requests for reprints: Denis S.F. Biard, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, Commissariat à l'Energie Atomique, Département de Radiobiologie et de Radiopathologie, Direction des Sciences du Vivant, BP 6, 92265 Fontenay aux Roses, France. E-mail: denis.biard@cea.fr

Copyright © 2005 American Association for Cancer Research. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0044

replication protein A, XPA, and XPG proteins. The opening of the helix at the damage site is necessary for subsequent dual incision by the two structure-specific NER endonucleases, XPF-ERCC1 and XPG, which causes the release of a stretch of 25 to 30 nucleotides containing the lesion (5).

Because XPA and XPC proteins are key components in the lesion recognition steps of the NER pathway, we sought to determine the implication of these proteins in UVC sensitivity in human syngeneic cells. We have developed a new family of vectors for imposing stable and long-term gene silencing in human cells without using a virus vehicle. In recent years, RNA interference has emerged as a promising technology to knock down the expression of specific genes in human cells. RNA interference is characterized by coordinated cellular pathways that induce the silencing of specific genes by the expression of cognate small double-stranded RNAs. Tuschl et al. (8) described the initial design for the synthesis of a 21-nucleotide small interfering RNA (siRNA) which efficiently suppresses gene expression without inducing the IFN pathway. Transfection of siRNA duplexes subsequently proved effective in the field of reverse genetics (9). However, the transient nature of gene silencing induced by transfection of siRNA duplexes hampered this approach. A major breakthrough was made in a pioneering study describing the pSUPER plasmid (10). pSUPER allowed transient knockdown of both exogenous and endogenous genes. This plasmid carries the H1 RNA polymerase III promoter to drive the transcription of short hairpin RNA (shRNA) giving rise to siRNA-like molecules *in vivo*. In parallel, long-term expression was attempted using siRNA-based virus systems (retrovirus, lentivirus, or adenovirus). However, safety and ethical concerns about the handling of these viruses could be a major drawback (11). Until now, most of the published articles on gene silencing have described transient transfections of cultured cells with either siRNA duplexes or plasmids. Interestingly, authors always used integrative plasmids carrying (or not) a selective marker. These vectors could lose their siRNA cassette during the selection pressure. Besides, a high copy number of siRNA-based plasmid per cell should saturate the RNA interference machinery (e.g., the RISC complex) triggering unwanted side effects (12). As a consequence, this considerably hampered the establishment of stable cell populations and only a few stable clones were characterized for a reduced period of time in culture (13-15).

To alleviate these shortcomings, we combined the efficiency of both EBV-based vectors with the siRNA approach to establish cell lines expressing a given shRNA for a long time (>300 days). EBV-based vectors have been used to efficiently modify the human cell genotype (16, 17). To show the usefulness of this approach, we used these vectors to mimic the behavior of cells derived from xeroderma pigmentosum patients and to assess the long-term consequences of gene silencing in nearly syngeneic cells. Beside *XPA* and *XPC*, we also silenced *HSAKIN17* (*Homo sapiens KIN17*) which encodes a nuclear zinc finger protein involved in DNA replication (18), RNA processing (19), and in the cellular response to DNA damage (20, 21).

We show that *HSAKIN17* and *XPC* gene silencing dramatically impeded cell growth a few weeks after transfection. In contrast, *XPA* knockdown did not impede cell viability and growth, and numerous clones were easily obtained. Thereafter, these XPA^{KD},

XPC^{KD}, and KIN17^{KD} HeLa clones remained stable even after more than 300 days of culture. The classic features of xeroderma pigmentosum cells were maintained in XPA^{KD} and XPC^{KD} clones (e.g., UVC sensitivity) and presented impaired unscheduled DNA synthesis after UVC irradiation. We show that XPC^{KD} HeLa cells were more sensitive to UVC than their XPA^{KD} or KIN17^{KD} counterparts. As expected, EBV-based siRNA vectors were maintained in HeLa cells in an episomal form even after several months in culture, at about 10 vector copies per cell. Hygromycin B withdrawal rapidly led to the loss of these vectors, triggering the restoration of either XPA or XPC protein levels. Interestingly, we observed the reversion of the XP phenotype in HeLa XPA^{KD} cells but not in HeLa XPC^{KD} cell, which remained sensitive to UVC irradiation. This observation suggested that irreversible defects appeared with time in culture in HeLa XPC^{KD} cells.

Our results indicate that in HeLa cells, (i) *HSAkin17* participates indirectly in early events following UVC irradiation and it may be involved in the coordination between different pathways, such as DNA replication when unrepaired (or irreparable) DNA damage is present; and (ii) XPC deficiency strongly affects cell growth and contributes to UVC sensitivity to a greater extent than does XPA. Our data illustrate that the use of EBV-based siRNA vectors is a promising tool in the field of gene silencing and reverse genetics.

Results

Comparison between siRNA Duplexes, Integrative Plasmids, and EBV-Based siRNA Vectors

We used *HSAKIN17* gene as a target to determine the experimental conditions for efficient gene silencing. First, we sought to compare gene silencing efficiencies induced by either siRNA duplexes or EBV-based siRNA vectors. Two *HSAKIN17* siRNAs (siK180 and siK906) were synthesized as double-stranded RNAs and transfected into HeLa or RKO cells. DNA sequences coding for shRNA were designed and introduced into EBV vectors in dual orientations to check whether the position relative to the other genetic elements modifies their expression. The cloning scheme is summarized in Fig. 1 and the vectors are listed in Table 1.

Three days after transfection with either siRNA duplexes (siK180 and siK906) or EBV vectors carrying these sequences, we observed an 80% to 90% decrease in the *HSAkin17* protein level using two different well-characterized monoclonal antibodies, without changes in other nuclear proteins tested (Fig. 2A). This illustrates the efficiency and the specificity of EBV vector-mediated gene silencing. Rapidly during hygromycin B selection, EBV-based vectors triggered an improved gene silencing (Fig. 2B; 10 and 18 days posttransfection). It was noteworthy that the orientation of the siRNA cassette inside EBV vectors slightly influenced the silencing of *HSAKIN17* gene. The reverse orientation seemed to be more efficient in imposing gene silencing. Because siRNAs could induce nonspecific effects on protein levels (22), we investigated this possibility by comparing the different knockdown clones themselves and with various controls during the whole culture period. In this way, we constructed a "control" vector carrying an oligonucleotide coding for an shRNA harboring two mismatches in one strand of the hairpin structure (pBD650).

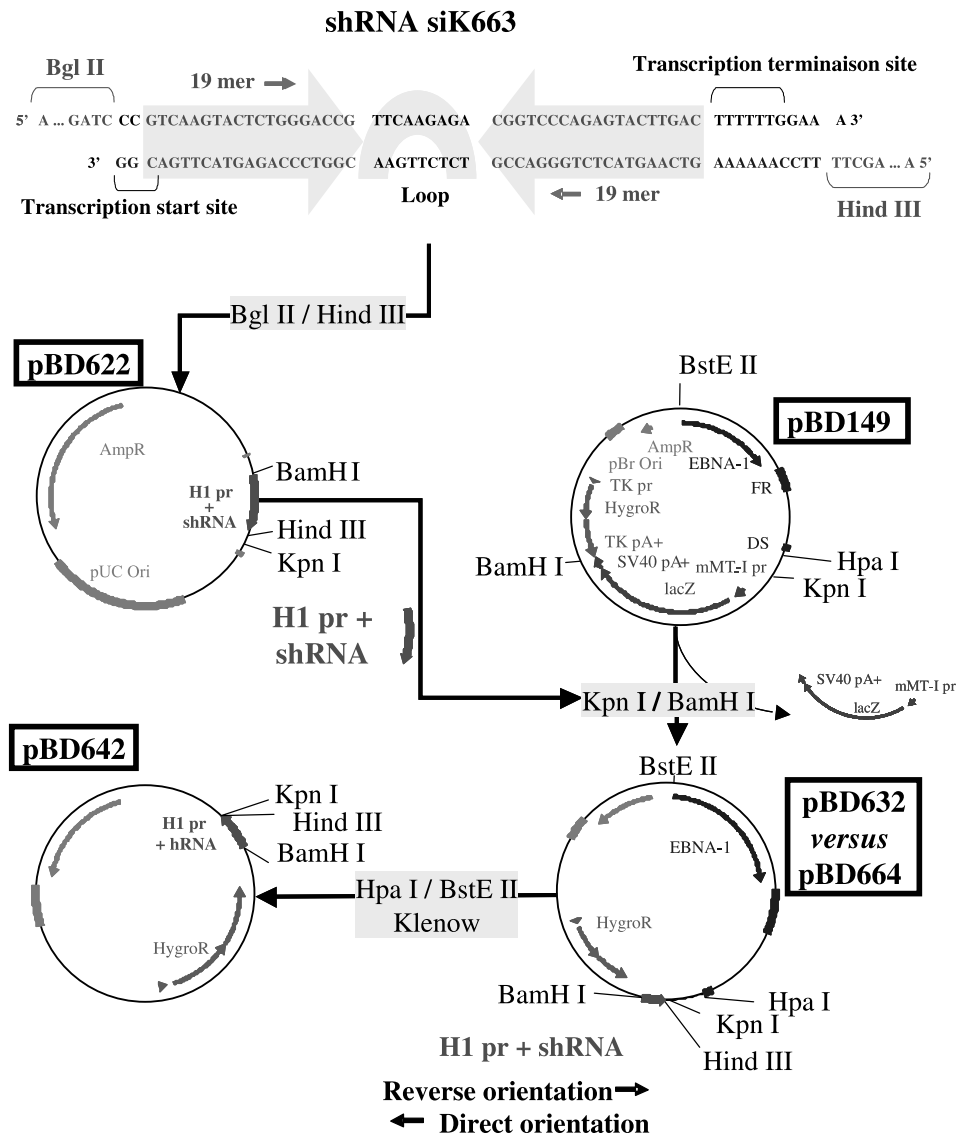


FIGURE 1. Cloning strategy of EBV-based siRNA vectors. Synthetic double-stranded oligodeoxynucleotides coding for shRNA sequences were synthesized (Eurogentec S.A. Seraing, Belgium) according to a model adapted from Agami and collaborators (10). shRNA sequences contain two identical 19-nucleotide motifs in an inverted orientation, separated by a 9-bp spacer of nonhomologous sequences (TTCAAGAGA). We added six thymidines at the 3' end of the repeat to function as a termination signal for RNA polymerase III and the CCG sequence at the 5' end to determine the initiation site. *Bgl*II and *Hind*III cloning sites were fitted at the 5' and 3' extremities, respectively, of the double-stranded shRNA sequence for subsequent cloning. Sense and antisense oligodeoxynucleotides were annealed to make a double-stranded DNA coding for shRNA with protruding *Bgl*II and *Hind*III ends. They were inserted into the *Bgl*II/*Hind*III sites of the pSUPER plasmid, giving rise to pBD622 (3,230 bp). siRNA cassettes (H1 promoter and shRNA coding sequence) were checked by sequencing, digested with *Kpn*I/*Bam*HI (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA), and introduced into an EBV vector (pBD149; "Biard et al. Regulation of the *Escherichia coli* lac operon expressed in human cells. *Biochim Biophys Acta*, 1130:68-74, 1992"). For subsequent cloning, annealed shRNA sequences were directly introduced into pBD631 or pBD665 plasmids (empty vectors with a reverse or direct orientation of the siRNA cassette). Integrative plasmids were obtained from EBV vectors after deletion of EBV sequences (*Hpa*I/*Bst*EII digestion, Klenow filling, and self-ligation), giving rise to the pBD642 (4,784 bp). Genetic map of one EBV-based siRNA vector: FR, family of repeats; DS, dyad symmetry element; *HygroR*, hygromycin B resistance gene; TK pr, herpes simplex virus thymidine kinase promoter; TKpA+, herpes simplex virus-TK polyadenylation signal; pBr ori, pBR322 origin of replication; *AMP*r, bacterial α -lactamase gene.

We also transfected "empty" EBV vectors carrying the H1 promoter in the two orientations without the shRNA sequence (pBD631 and pBD665). To compare EBV versus integrative vectors, we deleted the EBV sequence from these vectors giving rise to integrative plasmids named pHygro-siRNA (see figure 1). Thirteen days after transfection, clonogenic cell growth assays revealed a higher number of silenced clones with EBV-based siRNA vectors (pBD632 and pBD634) in comparison

with pHygro vectors (pBD642 and pBD657). More precisely, transfection of integrative plasmids (pHygro siRNA) entailed a few growing clones: 194 ± 48 clones with the pBD641 plasmid (no shRNA), 56 ± 48 with pBD642 (KIN17 shRNA), 28 ± 48 with pBD657 (XPC shRNA), and 222 ± 48 with pBD653 (mismatched shRNA). Sixty percent of these clones failed to knock down the gene of interest (for KIN17: Fig. 2C, 2 versus 1). In contrast, numerous clones emerged a few days

Table 1. Replicative pEBV versus Integrative Vectors

siRNA/Gene* (Nucleotide Position)	GenBank Accession or Remarks	Vectors			
		pSuper Derivatives	pEBV Reverse	pEBV Direct	pHygro
Control 1	Mismatched shRNA sequence	pSUPER-siControl <i>pBD647</i>	pEBV-siControlR <i>pBD650</i>		pHygro-siControl <i>pBD653</i>
Control 2	No shRNA sequence	pSUPER-si <i>pBD621</i>	pEBV-siR <i>pBD631</i>	pEBV-siD <i>pBD665</i>	pHygro-si <i>pBD641</i>
siK180/kin17 (nt 180-198)	NM-012311	pSUPER-siK180 <i>pBD667</i>	pEBV-siK180R <i>pBD674</i>	pEBV-siK180D <i>pBD678</i>	
siK663/kin17 (nt 663-681)	NM-012311	pSUPER-siK663 <i>pBD622</i>	pEBV-siK633R <i>pBD632</i>	pEBV-siK633D <i>pBD664</i>	pHygro-siK633 <i>pBD642</i>
siK906/kin17 (nt 906-924)	NM-012311	pSUPER-siK906 <i>pBD668</i>	pEBV-siK906R <i>pBD676</i>	pEBV-siK906D <i>pBD680</i>	
siXPC-267 (nt 267-285)	NM-004628	pSUPER-siXPC267 <i>pBD624</i>	pEBV-siXPC267R <i>pBD634</i>		pEBV-siXPC267 <i>pBD657</i>
siXPA-587 (nt 587-605)	NM-000380	pSUPER-siXPA587 <i>pBD688</i>	pEBV-siXPA587R <i>pBD695</i>		

*For the name of each siRNA sequence, "si" corresponds to siRNA, "K" to *HSAKIN17* (or the name of other genes), and "number" to the position of the first nucleotide of the siRNA sequence relative to the corresponding cDNA: *HSAKIN17* (siK180, siK663, and siK906), XPC (siXPC267), and XPA (siXPA587).

after transfection with EBV-based siRNA vectors: 44,250 ± 2,136 clones with the pBD631 plasmid (no shRNA), 417 ± 144 with pBD632 (KIN17 shRNA), 250 ± 144 with pBD634 (XPC shRNA), and 50,833 ± 5,700 with pBD650 (mismatched shRNA). Almost all of them down-regulated the gene of interest (Fig. 2C, 4 versus 3).

Strikingly, *HSAKIN17* and *XPC* knockdown dramatically hampered cell survival and the number of growing clones fell more than 100-fold compared with the controls. These results were confirmed in RKO cells (data not shown). The weaker effect of *KIN17* shRNA with integrative plasmids was probably due to a lower efficiency of gene silencing. When HeLa clones were picked up for culture propagation, most of them were

silenced for the gene of interest (e.g., all isolated XPA^{KD} clones were silenced in Fig. 3D). We concluded that the nuclear retention of EBV vectors in human cells greatly improves the expression of siRNA a few weeks after transfection.

Long-term XPA, XPC, and KIN17 Gene Silencing in Human Cells

We isolated both XPA^{KD} and XPC^{KD} clones after transfection of HeLa cells with the pBD695 and pBD634 vectors. XPA and XPC protein levels both fell a few days after transfection (data not shown) or several months later, and reached undetectable levels in Western blotting or immunocytochemical staining analysis (Fig. 3). In the different XPC^{KD} clones

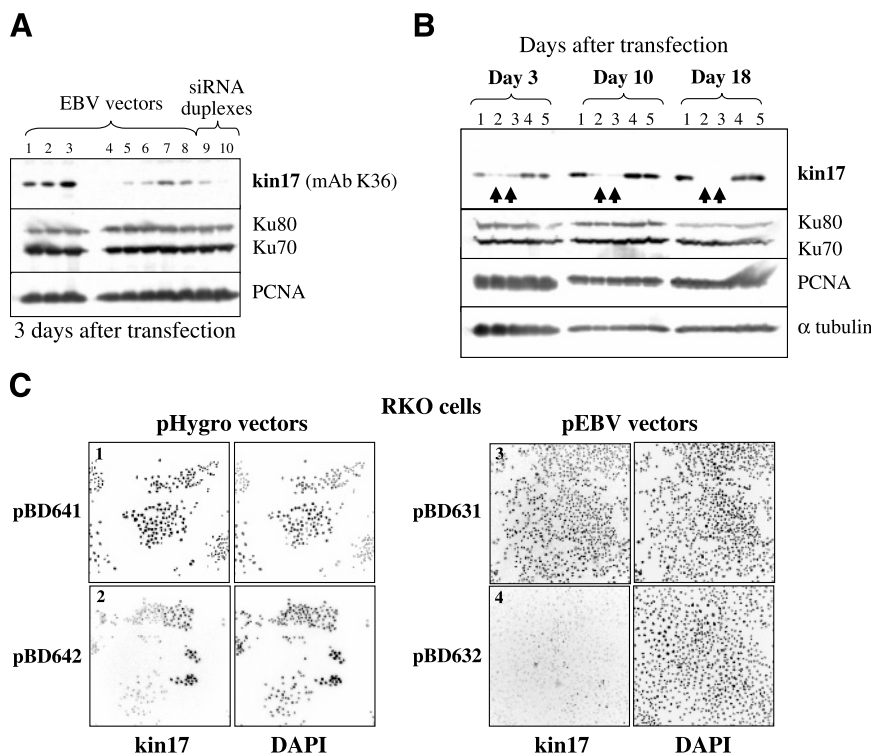


FIGURE 2. A. Comparison of transient *HSAKIN17* gene silencing induced by either siRNA duplexes or EBV-based siRNA vectors. Twenty-four hours after seeding, HeLa cells were transfected with either EBV vectors or siRNA. Three days later, cells were trypsinized, counted, and proteins were analyzed as described. 1, pBD631 (empty vector, reverse); 2, pBD665 (empty vector, direct); 3, pBD650 (control vector, reverse); 4, pBD632 (siK663 vector, reverse); 5, pBD674 (siK180 vector, reverse); 6, pBD676 (siK906 vector, reverse); 7, pBD678 (siK180 vector, direct); 8, pBD680 (siK906 vector, direct); 9, siRNA K180 duplex; 10, siRNA K906 duplex. **B.** Stability of *HSAKIN17* gene silencing 3, 10, and 18 days after transfection of HeLa cells with EBV vectors. 1, pBD631; 2, pBD632; 3, pBD664 (siK663 vector, direct); 4, pBD665; 5, pBD650. **C.** Enhanced efficiency of gene silencing mediated by EBV-based siRNA vectors in comparison with integrative plasmids. Forty-eight hours after transfection, 150,000 RKO cells were seeded in a 6 cm diameter dish in the presence of hygromycin B in the medium. Immunocytochemical staining of *HSAkin17* (immunoglobulin G K36; magnification, ×50). Cells were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. 1, pBD641 (empty vector, Hygro); 2, pBD642 (siK663 vector, Hygro); 3, pBD631; 4, pBD632.

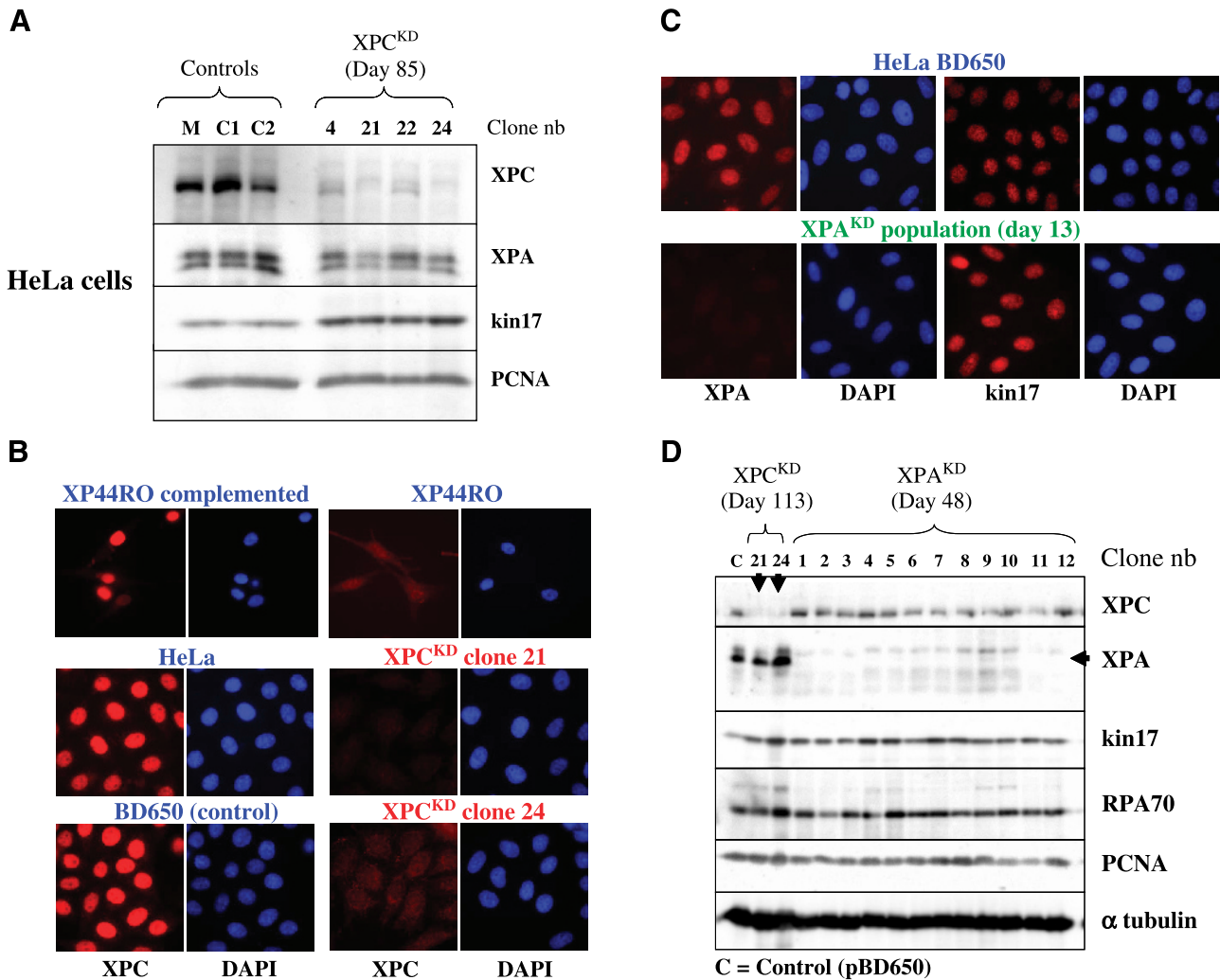


FIGURE 3. Isolation of stable XPA^{KD} and XPC^{KD} HeLa clones. **A.** Western blot analysis of four XPC^{KD} clones. M, mock-treated cells; C1, control vector (pBD650); C2, empty vector (pBD631). **B.** Immunocytochemical detection of XPC protein in two XPC^{KD} clones, in XP44RO cells and in the XPC-complemented XP44RO cells. Magnification, ×350. **C.** Immunocytochemical detection of XPA and HSAkin17 in a XPA^{KD} population 13 days after transfection. Magnification, ×350. **D.** Western blot analysis of 12 stable XPA^{KD} clones (48 days in culture) and 2 stable XPC^{KD} clones (113 days in culture).

recovered 85 and 113 days after transfection, XPC protein reached a level similar to that observed in classic human XPC cells (Fig. 3B). Similarly, 12 XPA^{KD} clones were picked up at random and grown. Forty-five days after transfection, all isolated clones failed to express detectable XPA protein (Fig. 3C and D). However, residual and undetectable levels of either XPC or XPA proteins might be present in our knockdown HeLa clones.

Interestingly, whereas XPC and HSAkin17 deficiency induced a dramatic decrease in cell growth a few days after transfection, no such decrease was observed with XPA (Fig. 4A). As a consequence, we rapidly obtained XPA^{KD} HeLa clones. In contrast, XPC^{KD} (two vectors) and KIN17^{KD} (four vectors) HeLa cells grew poorly; isolated clones were propagated in culture only after several weeks. These data indicate that XPC and HSAKIN17 gene deficiencies strongly affect cell growth at least in HeLa cells.

We assessed the UVC sensitivity of different knockdown HeLa clones by means of clonogenic survival assays after UVC irradiation (4 J/m²) during several months of culture. In the first

months following transfection, we systematically analyzed three XPA^{KD}, five XPC^{KD}, and two KIN17^{KD} HeLa clones, which gave rise to similar results. Afterwards, we followed only one clone per targeted gene. Whereas some fluctuations were observed in cell survival during these months of culture, it seems that about 84% of control cells (BD650) survived after a UVC irradiation at 4 J/m² (Fig. 4B). In contrast, we clearly showed that XPC^{KD} HeLa cells constantly displayed an elevated sensitivity to UVC, in particular a few months after transfection. Strikingly, XPA^{KD} HeLa cells were less sensitive to UVC than XPC^{KD} HeLa cells. For KIN17^{KD} HeLa clones, we observed a moderate UVC sensitivity (Fig. 4B). Our results showed an exceptionally stable gene silencing over time, even after 269 days of culture (data not shown).

By using the same aforementioned XPC^{KD} and XPA^{KD} clones, we assessed the unscheduled DNA synthesis after UVC irradiation as described elsewhere (23). We analyzed two stable XPC^{KD} HeLa clones (21 and 24) and two XPA^{KD} HeLa clones (3 and 6), which were maintained in continuous culture for

193 and 110 days, respectively. As expected, these clones displayed reduced repair capacity at all doses tested (5 to 20 J/m²) unlike control cells (MRC5-V1 cells or HeLa BD650 control cells; Fig. 4C). These data indicate that XPA and XPC deficiencies, imposed by EBV-based siRNA vectors for a long period of time, are correlated with the expected UV sensitivity characteristic of the XP phenotype.

Lack of Complete Reversion of XPC^{KD} Cells after Suppression of XPC Silencing

We sought to determine whether the long-term deficiency of either XPA or XPC protein could affect cellular integrity. Hygromycin B was removed from the medium for 10 days to cure cells of the episomes and to analyze the long-term consequences of gene knockdown. We observed a rapid (7-15

days) and complete restoration of normal XPA and XPC protein contents in both XPA^{KD} and XPC^{KD} cells as evidenced by Western blotting and immunocytochemical staining (Fig. 5A and B). To check if this restoration of XPA and XPC protein levels was due to the loss of all EBV episomes, genomic DNA was extracted, digested, and analyzed by Southern blotting. Our data clearly indicated that (i) EBV vectors designed for XPA or XPC gene silencing were maintained at about 10 copies per cell in both XPA^{KD} and XPC^{KD} clones; (ii) all of these copies were maintained in an episomal form; and (iii) drug removal was associated with the loss of all EBV copies (Fig. 5C).

Clonogenic survival assays were carried out to assess the sensitivity of reverted knockdown clones. Interestingly, whereas HeLa XPA^{KD} reverted to a nearly wild-type UV sensitivity, HeLa XPC^{KD} cells remained sensitive to UV after hygromycin

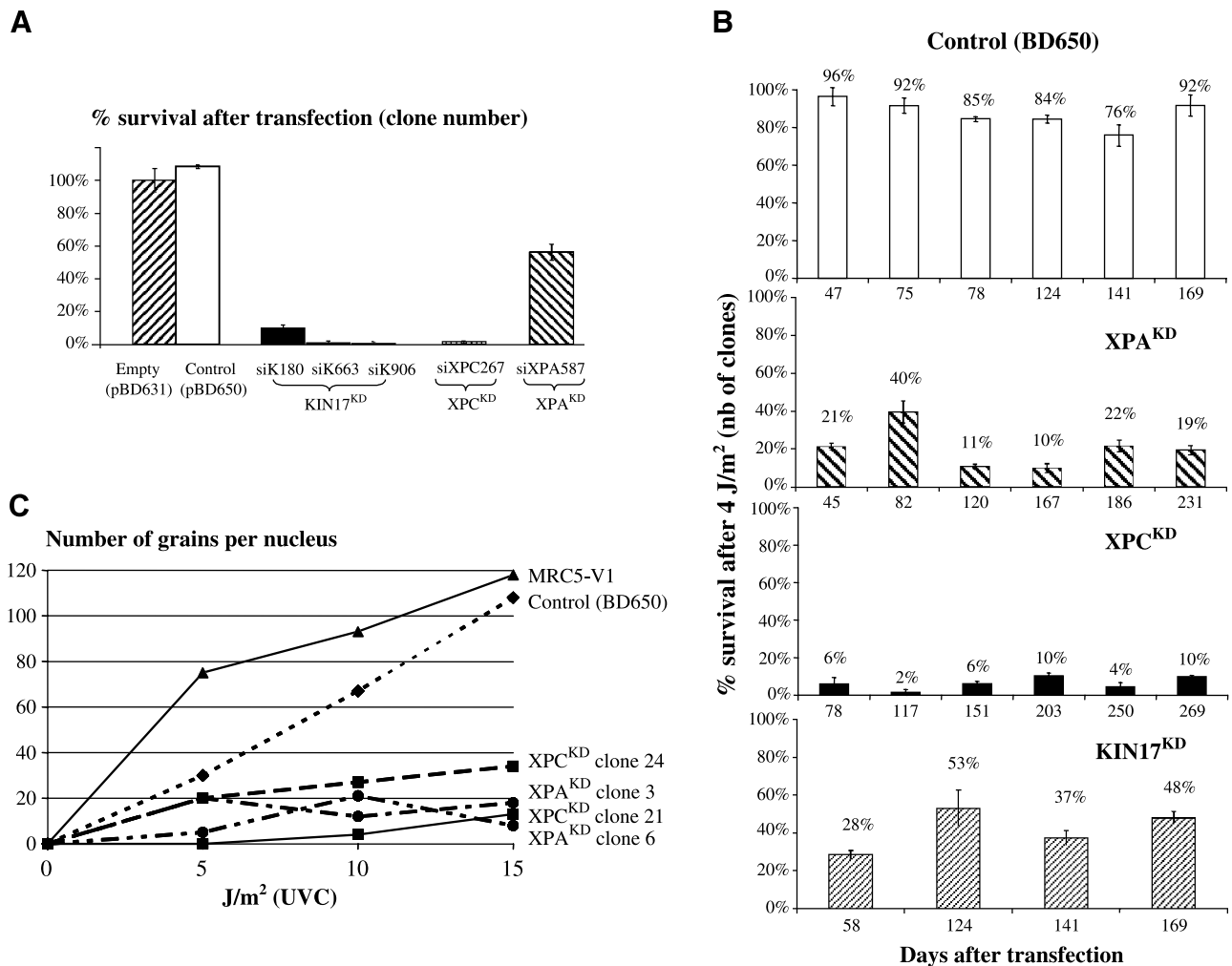


FIGURE 4. A. XPC^{KD} and KIN17^{KD} HeLa cells grow poorly 2 weeks after transfection. Forty-eight hours after transfection, cells were plated at the same density and grown in the presence of 250 µg/mL hygromycin B. Fourteen days later, clones were fixed and stained before counting. Columns, mean of three culture dishes; bars, SE. The experiments were replicated more than three times. For each cell line, results are expressed as a percentage of the control cell line. B. Higher UVC sensitivity of XPC^{KD} HeLa cells compared with XPA^{KD} and KIN17^{KD} syngeneic HeLa cells. Clonogenic cell growth assays after UVC irradiation (4 J/m²) were carried out at different times following transfection with control cells (BD650), KIN17^{KD}, XPC^{KD}, or XPA^{KD} HeLa. Cells were seeded at 500 cells per 6 cm diameter dish, irradiated 24 hours later, and analyzed after 14 days of culture. Columns, mean of three culture dishes; bars, SE. Results are expressed as a percentage of the control cell line (BD650) for each UVC irradiation experiment. C. Impaired unscheduled DNA synthesis in XPA^{KD} and XPC^{KD} clones after UVC irradiation. HeLa XPA^{KD} (clones 3 and 6; day 110 after transfection) and XPC^{KD} (clones 21 and 24; day 193) were plated onto coverslips in a growth suppression medium. Cells were irradiated and analyzed as described in Materials and Methods. The level of DNA repair is expressed as number of grains per nucleus as a function of UV dose.

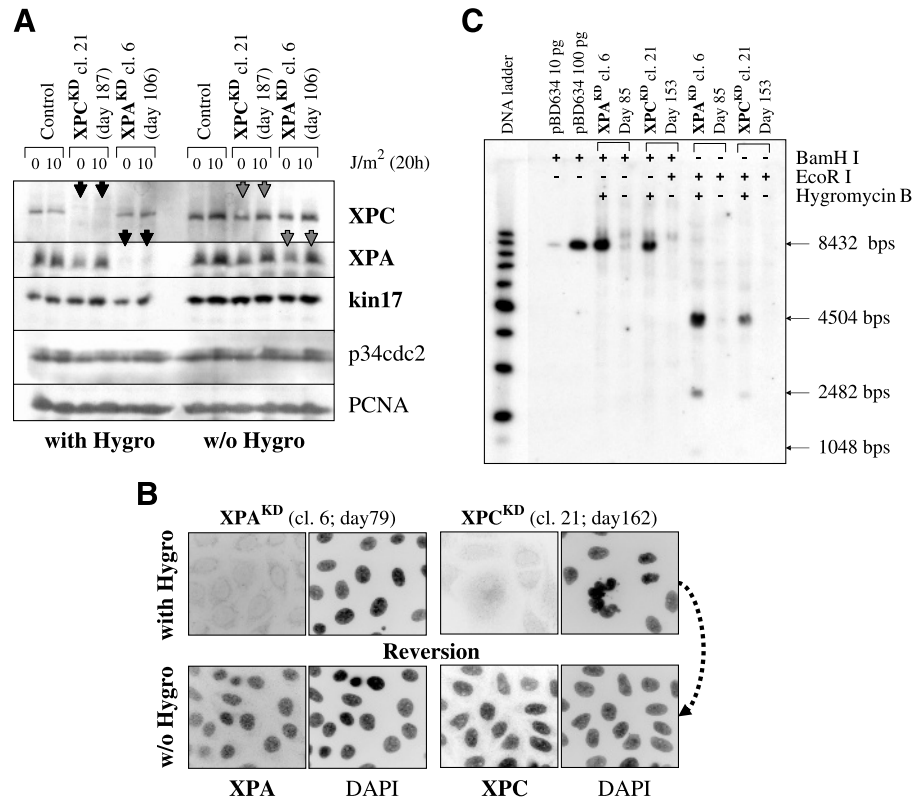


FIGURE 5. Recovery of normal XPA and XPC protein levels in XPA^{KD} and XPC^{KD} cells after hygromycin B withdrawal. HeLa clones were grown for 10 days in the presence or absence of 125 µg/mL hygromycin B. **A.** Cells were irradiated (UVC; 10 J/m²) and harvested 20 hours later. Cells were counted and lysed in Laemmli buffer. The equivalent of 100,000 cells was loaded onto 10% SDS-PAGE. **B.** Immunocytochemical analysis of XPA^{KD} and XPC^{KD} clones. Magnification, ×350. **C.** Episomal maintenance of EBV-based siRNA vectors and their total loss after hygromycin B removal. Total DNA was extracted, digested with either *Bam*HI or *Eco*RI, and submitted to Southern blot analysis with a specific probe for EBV-based siRNA vectors. With Hygro, cells were seeded with hygromycin B; w/o Hygro, hygromycin B was removed from the culture for 10 days.

B withdrawal (Fig. 6A). In parallel, we examined the S-phase arrest after acute UVC irradiation (10 J/m², cells being harvested 20 hours later) to determine whether remaining DNA damage could be blocking for DNA replication. Whereas control cells exhibited a G₂-M blockage, XPA^{KD} and XPC^{KD} cells were severely arrested at the G₁-early/S transition (Fig. 6B). A similar result was previously observed for XPV (14). After hygromycin B removal, we observed that reverted XPA^{KD} cells completely restored a normal cell cycle arrest after UVC. Interestingly, reverted XPC^{KD} cells accumulated at the G₁-early/S transition maintaining their XP phenotype.

We sought to determine the early sensitivity of XPA^{KD}, XPC^{KD}, and KIN17^{KD} clones to an elevated irradiation dose (acute UVC irradiation) in the presence or absence of hygromycin B (reversion experiment as described in Fig. 5). Twenty hours after UVC irradiation (15 J/m²), a 5-, 6-, and 15-fold increase in the number of dead cells was observed in KIN17^{KD}, XPA^{KD}, and XPC^{KD} HeLa cells, respectively, in comparison with control cells (as evidenced by 4',6-diamidino-2-phenylindole staining of adherent cells; Fig. 7; Table 2). In particular, 74% of XPC^{KD} cells rapidly died 20 hours after irradiation. This result confirmed the clonogenic survival assays and emphasized the striking sensitivity of XPC^{KD} cells toward UVC irradiation in the HeLa genetic background. After hygromycin B withdrawal, whereas a significant increase in the number of dead cells was always observed for XPC^{KD} (6-fold increase in comparison with control cells), 3- and 2-fold increases were seen with KIN17^{KD} and XPA^{KD} cells, respectively. These observations highlighted that XPC^{KD} HeLa cells were extremely UV sensitive soon after transfection and later.

Discussion

The long-term maintenance of gene silencing in isogenic cells may open a new area of research, in particular in the field of genetic diseases and cancer in which the loss of function of one gene takes place in a particular genetic background. These defects may be now analyzed over a long period of time. To date, the great majority of approaches have made use of integrative plasmids carrying (or not) a selection marker. Herein, we show that several months after transfection, replicative EBV vectors are stably maintained at about 10 copies per XPA^{KD} and XPC^{KD} cell, as evidenced by Southern blot analysis of genomic DNA. Therefore, replicative EBV vectors overcome these shortcomings and allow the establishment of cell lines presenting a stable down-regulated expression of a target gene.

The main properties of the EBV-based siRNA vectors presented here are that (i) transient gene silencing efficiencies reached a level similar to that observed with siRNA duplexes; (ii) more than 95% of cells were silenced 2 weeks after transfection (in comparison with an integrative plasmid giving rise to <50% of silenced cells); (iii) most isolated clones were silenced (e.g., 100% for XPA); (iv) in the selected clones, the protein of interest is still undetectable more than 300 days after transfection; (v) the phenotype associated with the loss of the targeted protein is maintained over the whole period; and (vi) the silencing is highly reproducible in different cell lines, such as HeLa, RKO, MRC5-V1, and immortalized human fibroblasts (data not shown), and with different vectors.

The striking efficiency of EBV-based siRNA vectors may be explained by their intrinsic features. In the presence of both

EBNA-1 protein and the latent replication origin of EBV virus (oriP), EBV plasmids persist in cell nuclei as stable episomes after a long period of culture. Their DNA replication is semiconservative: it initiates at or around the DS sequence (24) and is coordinated with genomic replication (25). Host cellular factors assist the EBV DNA replication. In particular, Orc2 tightly interacted with EBNA-1, which restricted EBV replication to a single round during each cell cycle, ensuring a low vector copy number per cell and a high stability (26, 27). EBNA-1 also tethers EBV episomes to metaphase chromosomes, providing the basis for their nuclear retention and their successful segregation at mitosis (28). Hence, EBV-based siRNA vectors behave like cellular transcription units tightly controlling low levels of siRNA transcription. Our results clearly illustrate that EBV-based siRNA vectors efficiently improve RNA interference by imposing stable and long-term gene silencing in human cells.

The loss of *XPA* gene expression does not significantly change cell growth and cell viability even several months after transfection. In contrast, *XPC* and *HSAKIN17* gene silencing dramatically decrease cell growth 2 months after transfection. We assume that in this period, cell metabolism compensates the decrease in *XPC* or *HSAKIN17* gene expression. Afterwards, *XPC*^{KD} and *KIN17*^{KD} HeLa cells are able to bypass this biological constraint and recover regular growth. In all cases, they maintained their sensitivity to UVC. Established *KIN17*^{KD} HeLa cells exhibited moderate sensitivity to UVC with about 40% survival after 4 J/m², in comparison with 84% survival of control cells. These data are consistent with the previously reported implication of *HSAkin17* protein in nucleic acid metabolism like replication and RNA processing (18-21).

The system described here can be used to compare *XPA*^{KD} or *XPC*^{KD} phenotypes in nearly syngenic HeLa cells differing

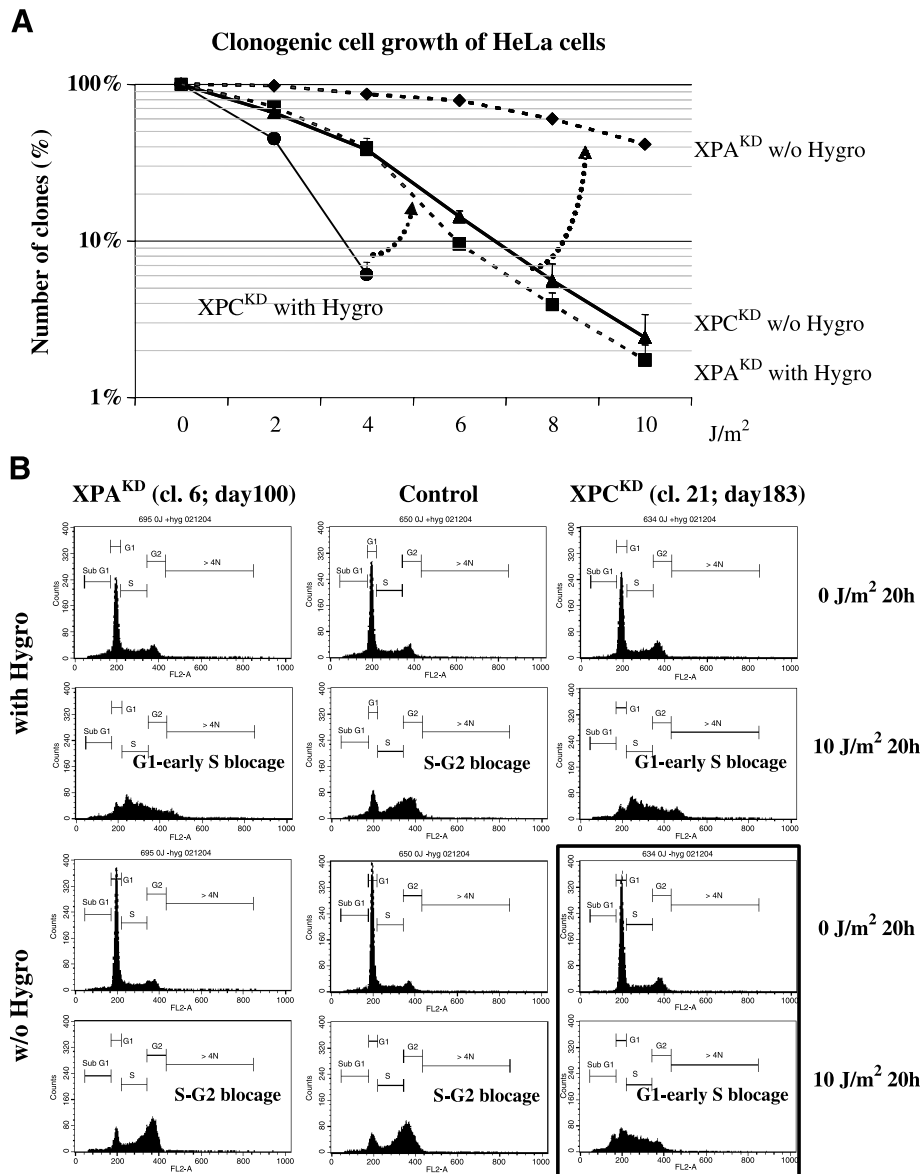


FIGURE 6. Hygromycin B withdrawal failed to reverse the XP phenotype in *XPC*^{KD} HeLa cells. **A.** Clonogenic cell growth of *XPA*^{KD} and *XPC*^{KD} HeLa cells grown in the presence or absence of 125 µg/mL hygromycin B. Points, mean of three culture dishes; bars, SE. **B.** Flow cytometry analysis of normal (control cells), *XPA*^{KD} (clone 6; 95 days after transfection), and *XPC*^{KD} (clone 21; 177 days after transfection) cells. Twenty-four hours after plating at the same density, cells were irradiated (10 J/m²); adherent cells were harvested 18 hours later and fixed before staining with propidium iodide. With Hygro, cells were seeded with hygromycin B; w/o Hygro, hygromycin B was removed from the culture for 10 days.

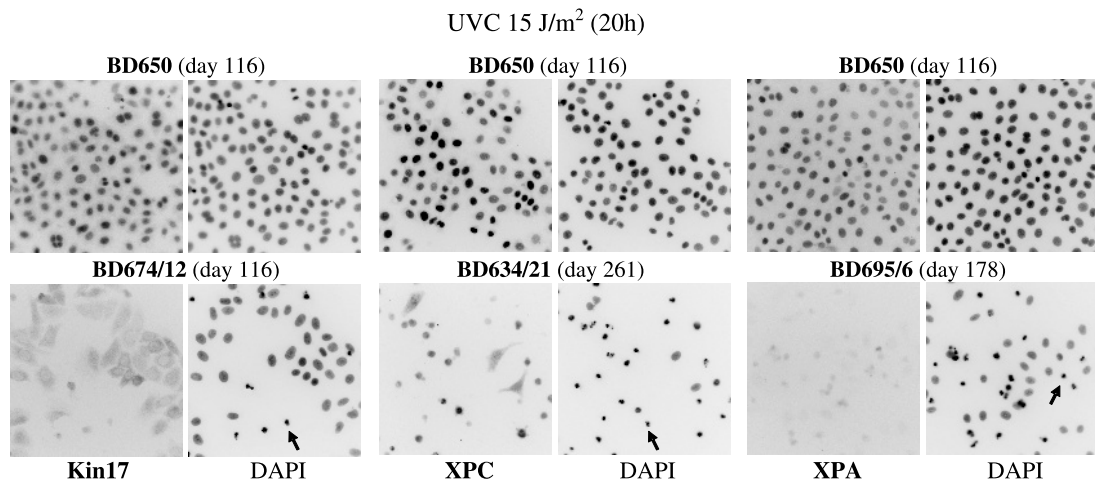


FIGURE 7. Increased cell death of XPC^{KD} clones in comparison with XPA^{KD} clones soon after acute irradiation. HeLa cells were seeded at the same density (400,000 cells per 6 cm diameter dish), irradiated at 15 J/m², and analyzed 20 hours later. Cells were stained with _{HS}Akin17, XPC, and XPA antibodies and counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole. Representative images for each clone. Magnification, ×350.

only in a small sequence of 40 nucleotides corresponding to the shRNA. XPC^{KD} cells seem to be more UV sensitive than XPA^{KD} cells (21% and 6% survival, respectively, after 4 J/m²). Our data are in apparent contradiction with previous reports on primary cells or established cell lines from XPA patients that are transcription-coupled repair- and global genome repair-deficient. These cells are more sensitive than those from XPC patients which are only global genome repair-deficient (29). However, it must be considered that HeLa cells express the viral E6 protein which impaired p53-dependent apoptosis in the transcription-coupled repair pathway, decreasing the death rate after UV irradiation. At the same time, it should be taken into account that XPA^{KD} cells may synthesize small amounts of XPA protein that are undetectable by Western blotting. It has been previously reported that a low amount of XPA protein could partially restore the UV resistance of an established XPA cell line although it does not lead to a completely normal UV resistance (30). Therefore, we conclude that reduced apoptosis rates and a partial complementation by XPA protein may explain why the UVC sensitivity of the HeLa XPA^{KD} cells, particularly soon after transfection, is lower than the sensitivity of the primary fibroblasts from XPA patients.

Interestingly, when XPC^{KD} cells are cured of the gene silencing imposed by EBV plasmid after hygromycin B withdrawal, the level of XPC protein increases but does not completely reverse all the characteristics of the XP phenotype. On the other hand, when XPA^{KD} cells lost their EBV plasmids, the XP phenotype was fully corrected. These data indicate that XPC deficiency triggers irreversible genetic defects in HeLa cells and lends further support to the idea that XPC protein plays an important role not only in DNA repair and mutagenesis but also in other important biological processes like damage signaling and cell cycle progression. The results of several other groups agree with this idea (31-33). In particular, the molecular characterization of a physical interaction between XPC and centrin-2 further reinforces the idea that a deficiency in XPC protein may decrease the efficiency of several mechanisms in which this protein is involved. We also entertain the idea that

the DNA-damage sensor activity of XPC may affect other repair pathways, explaining the extreme difficulty of isolating HeLa XPC^{KD} cells. The inactivation of this sensing activity should also contribute to the enhanced tumor development observed in XPC patients.

Alternatively, a long-term XPC deficiency may lower the concentration of hHR23B protein. A similar effect has been reported in fibroblasts from mHR23A/mHR23B double knock-out mice that present reduced amounts of XPC protein as well as a specific deficiency in global genome repair, resulting in a UV sensitivity comparable to that of XPC^{-/-} cells (31). Furthermore, hHR23B protein also interferes with the global genome repair reaction through the ubiquitin/proteasome system (34), and a reduced level of hHR23B protein could hamper the recruitment of other repair factors to DNA damage sites. Therefore, a long-term XPC deficiency could trigger a down-regulation (possibly through a hypermethylation process) of the hHR23B protein in HeLa cells, leading to the lack of full recovery on reexpression of XPC. The creation of HeLa cells presenting the silencing of other DNA repair pathways will help to shed some light on the mechanistic bases of the UV sensitivity.

Taken together, our results illustrate the generation of stable cell lines mimicking a human syndrome which should help us to unravel the molecular basis of cancer proneness.

Table 2. Percentages of Dead Cells 20 h after Acute UVC Irradiation

	Without Hygro	With Hygro
Control (BD650)	4.7 ± 0.9%	5.3 ± 1.7%
KIN17 ^{KD} (clone 12; day 116)	12.3 ± 1.6%	23.6 ± 4.1%
XPA ^{KD} (clone 12; day 178)	10.0 ± 4.1%	29.5 ± 1.0%
XPC ^{KD} (clone 21; day 261)	29.0 ± 0.2%	74.1 ± 3.8%

NOTE: Number of dead cells among adherent cells ± SD. Dead cells were identified as cells exhibiting apoptotic or necrotic features as indicated in Fig. 7 (arrows). About 2,000 adherent cells were counted. The experiment was replicated three times. With Hygro, cells were seeded with hygromycin B; without Hygro, hygromycin B was removed from the culture for 13 days.

Materials and Methods

siRNA Design and Cloning in EBV-Based siRNA Vectors

We designed XPA, XPC, and *HSAKIN17* siRNA considering Tuschl's rules with or without the recent thermodynamic recommendations (8, 35-37). siRNA sequences and subsequent vectors are detailed in Table 1. To compare gene silencing efficiencies between siRNA duplexes and EBV vectors, we used two annealed siK180 and siK906 double-stranded RNAs (Ambion, Austin, Texas) stored at -20°C before use. All siRNA sequences were submitted to a BLAST search against the human genome sequence to ensure that only one gene per sequence was targeted.

Synthetic double-stranded oligodeoxynucleotides coding for shRNA sequences were synthesized (Eurogentec S.A., Seraing, Belgium) according to a model adapted from Brummelkamp et al. (10). shRNA sequences contain two identical 19-nucleotide motifs in an inverted orientation, separated by a 9-bp spacer of nonhomologous sequences (TTCAAGAGA). We added six thymidines at the 3' end of the repeat to function as a termination signal for RNA polymerase III, and the CCG sequence at the 5' end to determine the initiation site. *Bgl*II and *Hind*III cloning sites were fitted at the 5' and 3' extremities, respectively, of the double-stranded shRNA sequence for subsequent cloning. The cloning strategy with one oligodeoxynucleotide is summarized in Fig. 1. Two sets of vectors were constructed by introducing siRNA cassettes in a reverse or direct orientation. As control, we used plasmids carrying an H1 promoter without an shRNA sequence (pBD631 and pBD665) or containing an shRNA sequence with two mismatches in one strand of the hairpin structure (pBD650). All plasmid DNAs were purified using an anion-exchange resin and transfected (QIAGEN, GmbH, Hilden).

Cell Culture

HeLa (cervical adenocarcinoma), MRC5-V1 (SV40-transformed normal fetal fibroblasts), RKO (colorectal carcinoma), and XP44RO versus XPC-complemented XP44RO melanoma cells were maintained in DMEM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10% FCS, 100 units/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, under 5% CO_2 . Culture conditions were optimized for transfection of either siRNA or EBV vectors. HeLa and RKO cells were seeded at 10,000 cells/ cm^2 and transfected 24 hours later using 3 μL of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with either 2 μg of DNA or siRNA duplexes (60 nmol/L final concentration). Transfection experiments and subsequent analysis of cell populations were replicated more than 10 times.

Transfected cells were propagated in culture in the presence of hygromycin B (Invitrogen) at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for HeLa and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for RKO. For clonogenic growth after UVC irradiation, cells were plated at 500 cells per 6 cm diameter dish and irradiated 24 hours later. Growing clones were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with methylene blue after 14 days of culture. Clones containing more than 50 cells were counted. Each point represents the mean of three culture dishes. Colony formation was normalized as a percentage of the control. For acute UVC irradiation (15 J/m^2 , cells being examined 24 hours later), each clone was seeded at 400,000 cells per 6 cm diameter dish 2 days before irradiation.

Western Blot and Immunostaining

Procedures are described elsewhere (38). We used purified immunoglobulin G K36 and immunoglobulin K58 directed against *HSAkin17* protein; monoclonal antibody anti-Ku70 (clone N3H10, Lab Vision/Neomarkers, Fremont, CA); anti-Ku80 (clone 111, Vision/Neomarkers), anti-RPA70 (clone RPA70-9, Oncogene Research Products, Calbiochem, Darmstadt, Germany), α -tubulin (clone B-5-1-2, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), proliferating cell nuclear antigen (clone PC10, Novo Castra, Newcastle, United Kingdom), p34cdc2 (clone sc54, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), pAbaXPC (a gift from Wim Vermeulen), and monoclonal antibody XPA (a gift from Yue Zou).

Flow Cytometry

Cells were collected by trypsinization, washed with PBS, and fixed in 75% ethanol at 4°C for at least 24 hours. Cells were washed twice in PBS and nuclear DNA was stained with propidium iodide (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma) in the presence of RNase (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma) in PBS for at least 30 minutes. Stained cells were analyzed on a FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) using CellQuest software. 10,000 cells gated as single cells using FL2A/FL2W scatter were analyzed.

Unscheduled DNA Synthesis after UVC Irradiation

The ability of cells to repair UV-induced damage was adapted from a method previously described (23). Briefly, cell growth was arrested in a medium containing 1% serum for 48 hours. Hydroxyurea was added to a final concentration of 20 mmol/L 3 hours before UVC irradiation (254 nm) at 0, 5, 10, and 15 J/m^2 and labeled for 3 hours in the growth suppression medium supplemented with [^3H]thymidine, followed by 1 hour of chase with cold thymidine. Coverslips with cells were mounted onto glass slides dipped in Amersham EM-1 photoemulsion. The mean number of grains per nucleus was obtained by counting 50 non-S-phase nuclei for each UV dose.

Total DNA Extraction and Southern Blotting

Total DNA (genomic and episomal) was extracted using DNA Lock Gel (Eppendorf) and quantified. The equivalent of 8 μg of DNA was digested with either *Bam*HI or *Eco*RI. Digestions were separated on a 0.6% agarose gel and submitted to Southern blotting on Hybond N^+ membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom). Blots were hybridized with a mix of pBD695 and pBD634, linearized, and [α - ^{32}P]dCTP labeled by random priming (Ready-to-go kit, Amersham).

Acknowledgments

We thank R. Agami (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands) for kindly providing the plasmid pSUPER. We particularly thank W. Vermeulen and S. Bergink (Centre for Biomedical Genetics, Erasmus Medical Center, Rotterdam, the Netherlands) for having kindly provided XPC antibody and Y. Zou (College of Medicine, East Tennessee State University, Johnson City, Tennessee) for XPA antibody. We are grateful to C. Debacter for her contribution to the unscheduled DNA synthesis assay.

References

1. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:22–33.
2. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366–74.
3. Venema J, van Hoffen A, Natarajan AT, van Zeeland AA, Mullenders LH. The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA. *Nucleic Acids Res* 1990;18:443–8.
4. You JS, Wang M, Lee SH. Biochemical analysis of the damage recognition process in nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 2003;278:7476–85.
5. Okuda Y, Nishi R, Ng JM, et al. Relative levels of the two mammalian Rad23 homologs determine composition and stability of the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1285–95.
6. Missura M, Buterin T, Hindges R, et al. Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair. *EMBO J* 2001;20:3554–64.
7. Rademakers S, Volker M, Hoogstraten D, et al. Xeroderma pigmentosum group A protein loads as a separate factor onto DNA lesions. *Mol Cell Biol* 2003;23:5755–67.
8. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494–8.
9. McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 2002;3:737–47.
10. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550–3.
11. Romano G, Claudio PP, Tonini T, Giordano A. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derived vectors: safety considerations and controversy over therapeutic applications. *Eur J Dermatol* 2003;13:424–9.
12. Editors of *Nature Cell Biology*. Whither RNAi? *Nat Cell Biol* 2003;5:489–90.
13. Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 2003;22:5938–45.
14. Laposa RR, Feeney L, Cleaver JE. Recapitulation of the cellular xeroderma pigmentosum-variant phenotypes using short interfering RNA for DNA polymerase H. *Cancer Res* 2003;63:3909–12.
15. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002;16:948–58.
16. Biard DS, Cordier A, Sarasin A. Establishment of a human cell line for the detection of demethylating agents. *Exp Cell Res* 1992;200:263–71.
17. Calos MP. The potential of extrachromosomal replicating vectors for gene therapy. *Trends Genet* 1996;12:463–6.
18. Miccoli L, Frouin I, Novac O, et al. The human stress-activated protein kin17 belongs to the multiprotein DNA replication complex and associates *in vivo* with mammalian replication origins. *Mol Cell Biol* 2005;25:3814–30.
19. Pinon-Lataillade G, Masson C, Bernardino-Sgherri J, et al. KIN17 encodes an RNA-binding protein and is expressed during mouse spermatogenesis. *J Cell Sci* 2004;117:3691–702.
20. Biard DS, Miccoli L, Despras E, et al. Participation of kin17 protein in replication factories and in other DNA transactions mediated by high molecular weight nuclear complexes. *Mol Cancer Res* 2003;1:519–31.
21. Angulo JF, Mauffrey P, Pinon-Lataillade G, Miccoli L, Biard DSF. Putative roles of kin17, a mammalian protein binding curved DNA, in transcription. In: E. Takashi, editor. *DNA Conformation and Transcription*, Ohyama, Konan University: Landes Biosciences; 2005.
22. Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, et al. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:1892–7.
23. Sarasin A, Blanchet-Bardon C, Renault G, Lehmann A, Arlett C, Dumez Y. Prenatal diagnosis in a subset of trichothiodystrophy patients defective in DNA repair. *Br J Dermatol* 1992;127:485–91.
24. Collins CM, Medveczky PG. Genetic requirements for the episomal maintenance of oncogenic herpesvirus genomes. *Adv Cancer Res* 2002;84:155–74.
25. Dhar SK, Yoshida K, Machida Y, et al. Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell* 2001;106:287–96.
26. Chaudhuri B, Xu H, Todorov I, Dutta A, Yates JL. Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10085–9.
27. Schepers A, Ritz M, Bousset K, et al. Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J* 2001;20:4588–602.
28. Kapoor P, Frappier L. EBNA1 partitions Epstein-Barr virus plasmids in yeast cells by attaching to human EBNA1-binding protein 2 on mitotic chromosomes. *J Virol* 2003;77:6946–56.
29. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press; 1995.
30. Muotri AR, Marchetto MC, Suzuki MF, et al. Low amounts of the DNA repair XPA protein are sufficient to recover UV resistance. *Carcinogenesis* 2002;23:1039–46.
31. Ng JM, Vermeulen W, van der Horst GT, et al. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev* 2003;17:1630–45.
32. Nahari D, McDaniel LD, Task LB, Daniel RL, Velasco-Miguel S, Friedberg EC. Mutations in the Trp53 gene of UV-irradiated Xpc mutant mice suggest a novel Xpc-dependent DNA repair process. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:379–86.
33. Popescu A, Miron S, Blouquit Y, Duchambon P, Christova P, Craescu CT. Xeroderma pigmentosum group C protein possesses a high affinity binding site to human centrin 2 and calmodulin. *J Biol Chem* 2003;278:40252–61.
34. Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, et al. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 2005;121:387–400.
35. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003;115:209–16.
36. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115:199–208.
37. Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem* 2001;2:239–45.
38. Biard DS, Miccoli L, Despras E, Frobert Y, Creminon C, Angulo JF. Ionizing radiation triggers chromatin-bound kin17 complex formation in human cells. *J Biol Chem* 2002;277:19156–65.

Article V

Principes de l'analyse du NHEJ *in vitro*

Disposant de cellules syngéniques déficientes en protéines de la réponse cellulaire au stress génotoxique, je souhaitais déterminer leur capacité de réparation des DSB par la voie NHEJ. Plusieurs techniques permettent une telle analyse. Les méthodes *in vivo* vont de la transfection d'un plasmide linéarisé dans des cellules en culture à l'étude de la réparation d'un fragment d'ADN intégré dans le génome et portant un site de coupure enzymatique rare. Des techniques permettent également de quantifier les DSB induites directement dans le génome (champs pulsés, essai COMET) et d'étudier la cinétique et la précision de réparation. Pour ma part, j'ai choisi d'utiliser une technique *in vitro*.

1. Caractéristiques des tests de NHEJ *in vitro*

A) Intérêts des tests *in vitro* par rapport aux tests *in vivo*

Les tests de NHEJ *in vitro* sont basés sur l'utilisation d'extraits protéiques et d'un substrat généralement obtenu par linéarisation d'un plasmide par hydrolyse enzymatique (HE) (pour revue voir Labhart, 1999).

- Par rapport à l'analyse de cellules vivantes, l'utilisation de systèmes *in vitro* permet d'étudier le processus de réparation en évitant toute interférence avec les autres mécanismes cellulaires comme la régulation du cycle cellulaire ou la réplication.
- Les extraits protéiques peuvent aussi bien venir de cellules en culture que de tissus, tels le cerveau ou les testicules (Raghavan and Raman, 2004; Ren and de Ortiz, 2002).
- L'utilisation de substrats générés par HE d'un plasmide permet de mimer une cassure de structure simple et entièrement définie par la séquence et la configuration des extrémités

Résultats

d'ADN. *In vivo*, les DSB sont souvent plus complexes et la réparation se déroule dans un contexte chromatinien. Cependant, les tests *in vitro* peuvent être appliqués à des substrats plus complexes. Les extrémités 3'-phosphoglycolate sont une modification chimique couramment générée par les RI. Ce type de cassure peut être obtenu par l'action ciblée de radicaux libres sur un plasmide (Chen et al., 2001b). Un substrat obtenu par désintégration d'un ^{125}I inclus dans un nucléotide formant des triplex (TFO) est réparé 10 fois moins bien qu'un substrat linéarisé par HE. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus *in vivo*, ce qui confirme la validité de l'approche *in vitro* (Odersky et al., 2002). De même, des extraits nucléaires de fibroblastes primaires humains assurent la réparation de chromatine reconstituée (Siino et al., 2002). La chromatine est réparée avec une meilleure efficacité que l'ADN nu équivalent, suggérant que la structure chromatinienne est importante *in vivo*.

- La transfection de plasmides linéarisés dans des cellules en culture est un moyen simple d'étudier la réparation des DSB. Cependant, cette technique peut conduire à des résultats contradictoires. En particulier, une équipe a conclu par cette technique à l'implication de la protéine Ku80 dans l'efficacité et la fidélité du NHEJ (Liang and Jasin, 1996) alors que d'autres sont arrivés au résultat inverse (Han et al., 1997; Kabotyanski et al., 1998). En mettant directement en contact l'ADN et les extraits actifs, les tests *in vitro* permettent de s'affranchir des effets collatéraux de la transfection, comme les modifications que peuvent subir les extrémités du substrat dans le cytoplasme. Des substrats intégrés dans le génome existent. Cependant, ils restreignent l'analyse à un type d'extrémités (3' sortantes pour les substrats clivés par l'enzyme I-SceI).
- Le contenu protéique des extraits peut être modifié aisément, par addition de protéine purifiée ou immunodéplétion, afin d'étudier l'impact d'une protéine sur la réaction de réparation. Ainsi, l'addition d'anticorps dirigés contre la protéine XRCC4 ou sa déplétion

Résultats

entraîne une inhibition de la réparation par NHEJ (Baumann and West, 1998). L'immunodéplétion de la *polynucleotide kinase* (PNK) dans des extraits de cellules humaines entraîne une diminution de la jonction d'extrémités 5'-OH, suggérant que la PNK est impliquée dans la modification des extrémités nécessaire à leur ligature par LigIV (Chappell et al., 2002). Enfin, l'addition du complexe purifié XRCC4/LigIV dans des extraits de cellules de hamster déficientes en protéine XRCC4 restaure l'activité de réparation (Lee et al., 2003).

B) Difficultés inhérentes aux méthodes in vitro

La préparation d'extraits actifs nécessite un nombre important de cellules, en moyenne 500 millions, ce qui rend difficile l'utilisation de lignées primaires et la comparaison de nombreuses lignées. De plus, les deux facteurs suivants ont une influence sur les résultats des tests de NHEJ *in vitro* :

- Le ratio ADN/protéines. Le passage d'un ratio ADN/protéines faible (0,1 à 10 fmol d'ADN par μg de protéines) à un ratio élevé entraîne un basculement de la réparation (NHEJ) vers la dégradation (test de clivage) (Blanco et al., 2004).
- La concentration en ions Mg^{2+} . On suppose qu'à 0,5 mM Mg^{2+} seule la voie dépendant du complexe DNA-PK est active (Baumann and West, 1998; Zhong et al., 2002a). Cependant les concentrations physiologiques sont de l'ordre de 2 à 4 mM pendant l'interphase et de 4 à 17 mM pendant la phase M (Strick et al., 2001; Wang et al., 2003).

Enfin, il ne faut pas perdre de vue que la réparation par NHEJ est constituée de plusieurs voies et que, *in vivo*, l'organisation nucléaire et la structure chromatinienne peuvent jouer un rôle impossible à détecter avec les systèmes *in vitro*. L'interaction directe de l'ADN nu à réparer et des extraits protéiques peut favoriser des voies qui sont en fait minoritaires dans la cellule. Ceci constitue, à mon sens, leur défaut majeur et il convient donc d'être extrêmement prudent dans le choix des contrôles et l'interprétation des résultats.

2. Mécanismes du NHEJ *in vitro*

A) Produits obtenus après la réparation de coupures enzymatiques

Il existe plusieurs protocoles de NHEJ *in vitro* utilisant des extraits totaux, des extraits nucléaires ou des extraits fractionnés de cellules en culture (pour revue voir Pfeiffer et al., 2006 et Labhart, 1999). Ils présentent des différences d'efficacité de réparation, en particulier quand des extrémités d'ADN non complémentaires sont mises en présence, ainsi que des différences dans le spectre de produits de réparation obtenu.

Deux types de produits de réparation peuvent être détectés :

- Les produits circulaires monomériques correspondent à des jonctions intra-moléculaires et regroupent des intermédiaires ouverts (OC de l'anglais *open circle*, forme circulaire relaxée) et des plasmides entièrement re-circularisés (CCC de l'anglais *covalently closed circle*, forme circulaire super-enroulée).
- Les multimères linéaires de tailles variées (M) correspondent à des jonctions inter-moléculaires.

L'intérêt de systèmes *in vitro* générant des jonctions inter- et intra-moléculaires est qu'ils permettent généralement d'analyser l'ensemble du NHEJ, c'est-à-dire le NHEJ classique dépendant du complexe DNA-PK et les voies alternatives. Les résultats obtenus à partir de cellules de hamster chinois (CHO) déficientes en protéine Ku80 ou DNA-PKcs suggère que la formation de produits circulaires passe par la voie dépendant de DNA-PK (Feldmann et al., 2000). Certains protocoles sont limités à l'analyse de la multimérisation du substrat. Ces différences peuvent s'expliquer par la méthode de préparation des extraits protéiques, le ratio ADN/protéines et la concentration en ions Mg^{2+} .

Résultats

B) Une définition de la fidélité du NHEJ in vitro

Si le terme « fidélité » se comprend aisément quand le substrat utilisé présente des extrémités cohésives ou franches (restauration de la séquence originelle par ligature simple des extrémités), il n'en est pas de même quand des extrémités non complémentaires sont mises en présence. En effet, ces extrémités nécessitent d'être modifiées par des activités polymérase ou nucléase afin de rendre possible l'étape de ligature, ce qui a pour conséquence une modification de la séquence d'origine du plasmide.

Plusieurs modes de jonction existent, pouvant inclure l'addition ou la perte de nucléotides (Labhart, 1999). Cependant, l'analyse du NHEJ dans des extraits d'œufs de Xénope ou dans des cellules de mammifères a permis de mettre en évidence les modes de jonction privilégiés. Ces modes assurent une conservation maximale de la séquence d'origine et nous parlerons dans ce cas de réparation « précise » (Figure 14):

- Extrémités cohésives ou franches : ligature simple.
- Extrémités non complémentaires anti-parallèles (5'/5' et 3'/3'): chevauchement des extrémités (*overlap*). Les bases complémentaires présentes aux extrémités sont utilisées pour former des chevauchements partiels ou complets pouvant contenir des mésappariements. Des polymérase et/ou des nucléases seront nécessaires au remplissage des discontinuités et au clivage des bases non appariées, respectivement.
- Extrémités en butée (5'/franche, 3'/franche et 5'/3'): remplissage des extrémités saillantes (*fill-in*). Les séquences des extrémités saillantes mises en jeu sont totalement préservées par l'action des polymérase qui utilisent le groupe 3'-hydroxyle de l'extrémité 5' comme amorce.

Résultats

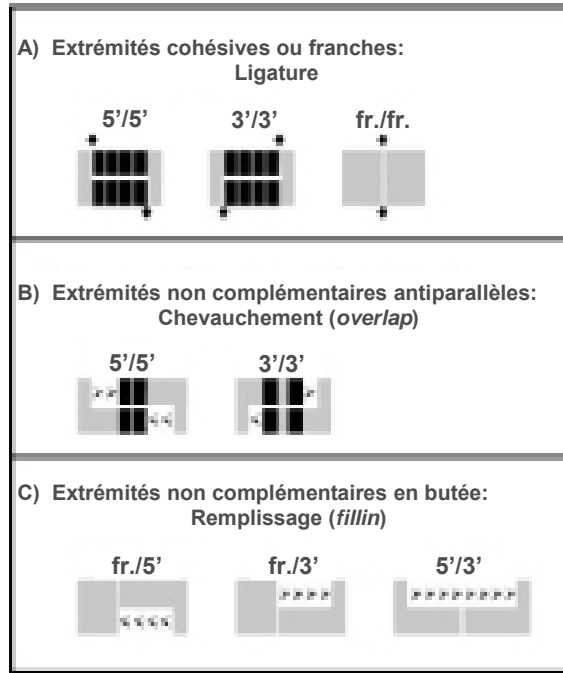
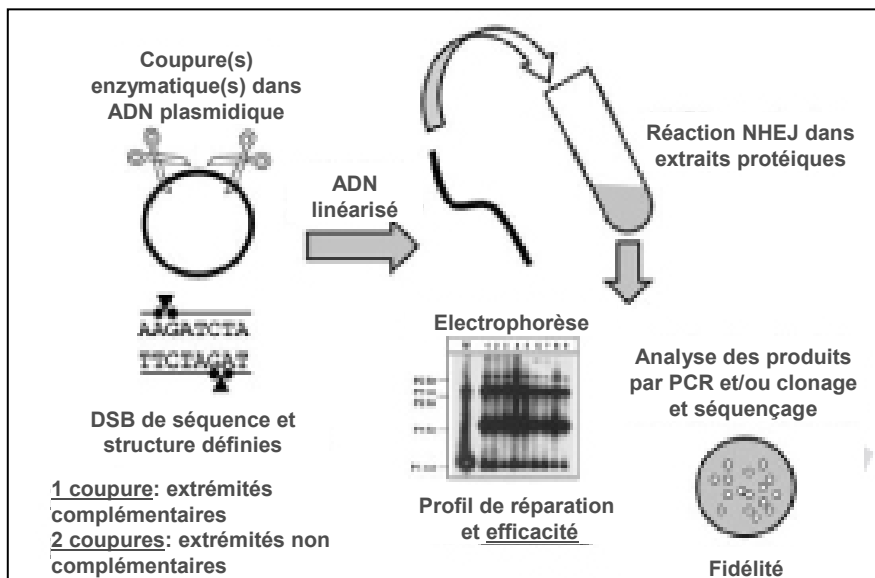


Figure 14: Modes de réparation précise des DSB créés par hydrolyse enzymatique par le NHEJ. (A) Les extrémités cohésives et franches sont réparées par ligature pour restaurer le site enzymatique initial. (B) Les extrémités anti-parallèles non-complémentaires forment des recouvrements totaux ou partiels (*overlap*) et les discontinuités sont remplies par des polymérase. (C) Les extrémités non-complémentaires en butée sont préservées par remplissage par une polymérase. Losanges: ligature; Carrés noirs: bases complémentaires; Flèches: synthèse d'ADN. (d'après Odersky et al., 2000).

A



B

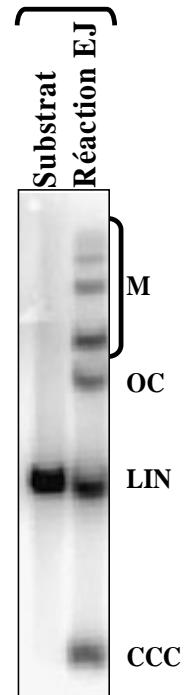


Figure 15: NHEJ *in vitro*. (A) Principe des tests de NHEJ *in vitro*: le substrat d'ADN obtenu par hydrolyse enzymatique est incubé en présence d'extraits protéiques. Les produits de réparation sont séparés sur gel d'agarose (analyse de l'efficacité) ou transformés dans la bactérie (analyse de la fidélité) (d'après Pfeiffer et al. 2005). (B) 10 ng d'un substrat obtenu par hydrolyse enzymatique est incubé 6 h à 25°C en présence d'extraits protéiques. L'ADN est déprotéiné et l'équivalent de 2 ng est séparé sur un gel d'agarose 1% contenant 1 µg/ml de BET. L'ADN est transféré sur une membrane, hybridé avec une sonde radioactive spécifique et les produits de réparation sont visualisés par imagerie phosphore. M: multimères; OC: *open circles*; LIN: substrat résiduel; CCC: *covalently closed circles*.

3. Protocole utilisé dans le cadre de cette thèse

J'ai choisi le protocole développé dans le laboratoire de Petra Pfeiffer (Essen, Allemagne) car il permet d'étudier à la fois les jonctions inter-moléculaires et intra-moléculaires (Daza et al., 1996; Pfeiffer et al., 2005). Un schéma de principe de ce protocole est présenté Figure 15 (voir la section Matériel et Méthodes pour un protocole détaillé).

A) Obtention d'extraits totaux actifs pour le NHEJ

Les cellules sont lysées dans un tampon hypotonique afin de libérer les noyaux intacts du cytoplasme. Les protéines nucléaires sont ensuite décrochées par un tampon hypertonique, sans séparer noyaux et cytoplasme. Une première extraction au sulfate d'ammonium (10% final) suivie d'une ultracentrifugation permet de se débarrasser des débris cellulaires et de la majorité de l'ADN. Le surnageant est alors soumis à une deuxième précipitation au sulfate d'ammonium (60% final) qui permet de concentrer la fraction protéique d'intérêt. Les protéines précipitées sont remises en solution, dialysées contre un tampon de stockage contenant des anti-protéases et des anti-phosphatases et peuvent être conservées plusieurs mois dans l'azote liquide.

B) Substrats

Les substrats présentant des extrémités cohésives ou franches sont obtenus par HE du plasmide pSP65 (Promega). Pour les substrats présentant des extrémités non complémentaires, un plasmide dérivé de pSP65 et présentant un insert d'ADN λ est digéré par un couple d'enzymes dont les sites encadrent l'insert. Ceci permet de s'assurer que la digestion est totale. Afin d'éviter toute contamination par le plasmide circulaire non digéré, la

Résultats

digestion est séparée sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium (BET, 1 µg/ml) et l'ADN linéaire est purifié.

La réparation précise de certains substrats permet la restauration d'un site enzymatique particulier. Ceci facilite l'analyse des produits de réparation. Parmi les substrats utilisés dans le laboratoire de Petra Pfeiffer (Tableau 4), j'en ai choisi 8 présentant cette caractéristique et permettant de couvrir tous les types de configuration d'extrémités (en grisé).

Substrat	Enzymes	Extrémités	Réparation précise	Site restauré
Bam	BamH I	5' cohésives	Ligature	BamH I
Pst	Pst I	3' cohésives	Ligature	Pst I
Sma	Sma I	franches	Ligature	Sma I
Bam/Asp	BamH I / Asp 718	5'/5'	Overlap	BamH I ou Asp 718
Bam/Sal	BamH I / Sal I	5'/5'	Overlap	x
BstX	BstX I	3'/3'	Overlap	BstX I
Kpn/Pst	Kpn I / Pst I	3'/3'	Overlap	x
Sma/Sal	Sma I / Sal I	franche/5'	Fill-in	x
Ava/Hind	Ava I / Hind II	5'/franche	Fill-in	Ava I
Sma/Pst	Sma I / Pst I	franche/3'	Fill-in	Pst I
Bam/Pst	BamH I / Pst I	5'/3'	Fill-in	Pst I
Sac/Sal	Sac I / Sal I	3'/5'	Fill-in	x
Eco/Kpn	EcoR I / Kpn I	5'/3'	Fill-in	x
Sac/Hind	Sac I / Hind III	3'/5'	Fill-in	x
Ava/Kpn	Ava I / Kpn I	5'/3'	Fill-in	Kpn I

Tableau 4 : Substrats pour le NHEJ *in vitro* . Les substrats sont obtenus par linéarisation d'un plasmide par une (extrémités cohésives ou franches) ou deux (extrémités non complémentaires) enzyme(s). Pour chaque substrat sont indiqués la configuration des extrémités, le mode de jonction précise et le site enzymatique restauré en cas de jonction précise. Les substrats utilisés dans cette étude sont sur-lignés en gris.

Résultats

C) Réaction de réparation et analyse des produits

Le substrat est incubé en présence d'extraits protéiques, d'ATP et de dNTP. La concentration finale d'ions Mg^{2+} dans la réaction est de 8 mM. Le ratio ADN/protéine est faible (5 fmol d'ADN pour 20 à 80 μg de protéines).

A la fin de l'incubation, la réaction est stoppée par l'addition de SDS. L'ADN est déprotéiné et séparé sur gel d'agarose contenant 1 $\mu g/ml$ de BET. Cette concentration de BET permet d'assurer la séparation des trois types de monomères : le substrat linéaire résiduel (LIN), les CCC et les OC.

L'ADN est transféré sur une membrane de nitrocellulose et hybridé avec une sonde radioactive spécifique du plasmide d'origine. Les produits de la réaction de réparation peuvent alors être visualisés par imagerie phosphore et quantifiés (logiciel ImageQuant). Un exemple du profil de réparation obtenu est présenté Figure 15B.

Résultats préliminaires

1. Optimisation du test de NHEJ *in vitro* sur des lignées humaines

A) Comparaison de la capacité de NHEJ in vitro dans différentes lignées

La lyse des cellules dans le tampon hypotonique doit être adaptée au type cellulaire afin d'obtenir une libération de 80% à 90% des noyaux et de les garder intacts. Les cellules HeLa nécessitent une incubation longue (40 min), suivie d'une homogénéisation. Des cellules plus fragiles comme les cellules des lignées HEK 293 (cellules de rein embryonnaire immortalisées) et RKO (carcinome colorectal) éclatent rapidement dans le tampon hypertonique (incubation de 5 et 10 min respectivement).

La préparation d'extraits actifs pour le NHEJ nécessite l'utilisation d'une grande quantité de cellules, de l'ordre de $0,5$ à 1.10^9 (préparation à grande échelle). L'extraction à grande échelle de cellules HeLa permet d'obtenir des extraits particulièrement actifs (Figure 16A). Pour les 15 substrats testés, tous les produits de réparation sont observables avec seulement $17 \mu\text{g}$ de protéines par réaction. Cette efficacité est plus importante que celle observée dans les extraits de hamster. Cela peut s'expliquer par un niveau plus élevé de DNA-PK dans les cellules humaines (Daza et al., 1996).

Il est possible d'adapter les étapes de centrifugation et de dialyse afin de préparer des extraits à partir de 50 à 100 millions de cellules sans perte d'efficacité (Diggle et al., 2003). Cette méthode à petite échelle permet de diminuer le volume du travail de culture des cellules et de comparer plus rapidement plusieurs lignées.

Résultats

J'ai testé l'activité NHEJ *in vitro* des cellules HeLa, RKO et HEK 293. Ces trois lignées présentent des activités NHEJ différentes (Figure 16B). L'efficacité de réparation est comparable et élevée dans les extraits de cellules HeLa et HEK 293 (55 à 75% selon le type d'extrémités pour 40 µg de protéines). Elle est en moyenne 3 fois moins importante dans les extraits de cellules RKO alors que la quantité de protéine utilisée est plus élevée (56 µg). On peut également noter une différence de réparation des substrats présentant des extrémités cohésives ou anti-parallèles dans les extraits de cellules HeLa et HEK 293. Pour ces types de configuration, les cellules HeLa privilégient les jonctions inter-moléculaires, alors que les cellules HEK 293 privilégient les jonctions intra-moléculaires. Ceci suggère que des voies différentes sont mises en jeu dans ces deux lignées et illustre la complexité du NHEJ.

B) Cinétique et température

Pour des extraits de cellules de hamster, le maximum d'efficacité de réparation est obtenu après 6 heures d'incubation à 25°C. Dans des extraits de cellules HeLa, l'efficacité est également plus importante à 25°C qu'à 37°C, température à laquelle ne sont formés que des multimères du substrat (Figure 17A). A 25°C, les trois types de produits de réparation (CCC, OC et M) apparaissent dès 30 min après le début de l'incubation et atteignent un maximum à 6 heures. J'ai obtenu des résultats similaires avec des extraits de cellules HEK 293 (Figure 17B). J'ai donc conservé les conditions d'incubation habituellement utilisées pour les cellules de hamster. Sauf indication contraire, la réaction de NHEJ est incubée 6 heures à 25°C.

Résultats

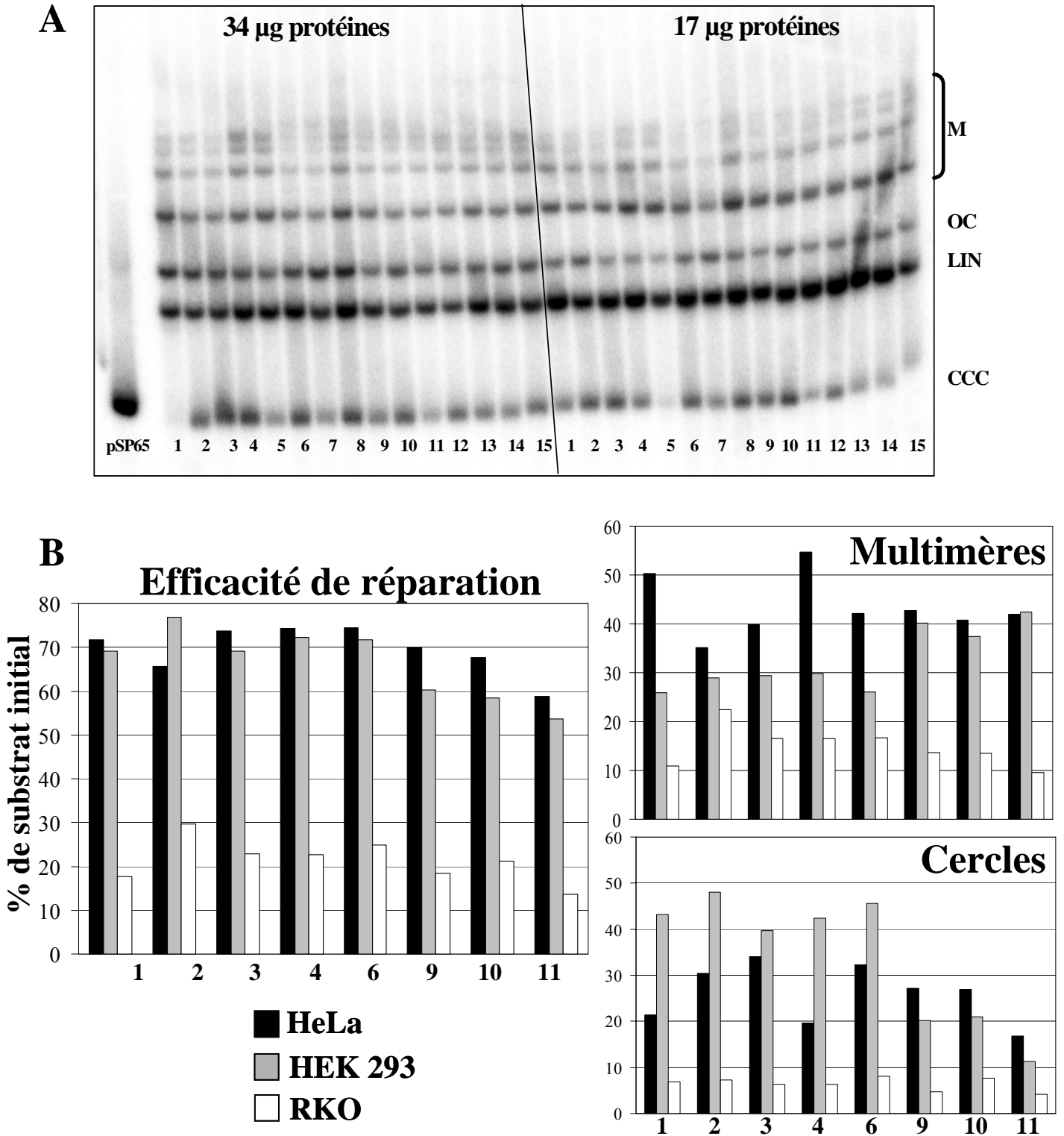


Figure 16: L'efficacité du NHEJ *in vitro* dépend du type d'extrémités et de la lignée cellulaire. (A) Les extraits de cellules HeLa sont compétents pour le NHEJ *in vitro* avec une efficacité qui varie selon la configuration des extrémités d'ADN en présence. 1: Bam (5' coh.); 2:Pst (3' coh.); 3: Sma (fr.); 4: Bam/Asp; 5: Bam/Sal (5'/5'); 6: BstX; 7: Kpn/Pst (3'/3'); 8: Sma/Sal; 9: Ava/Hind (fr./5'); 10: Sma/Pst (fr./3'); 11: Bam/Pst; 12: Sac/Sal; 13: Eco/Kpn; 14: Sac/Hind; 15: Ava/Kpn (5'/3'). **(B)** Comparaison de l'efficacité du NHEJ et de la répartition entre produits circulaires (OC+CCC) et multimères linéaires (M) dans les lignées HeLa (40 µg de protéines), HEK 293 (40 µg) et RKO (56 µg). Les substrats sont numérotés comme indiqué ci-dessus. Les produits sont quantifiés par le logiciel ImageQuant. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du substrat initial.

Résultats

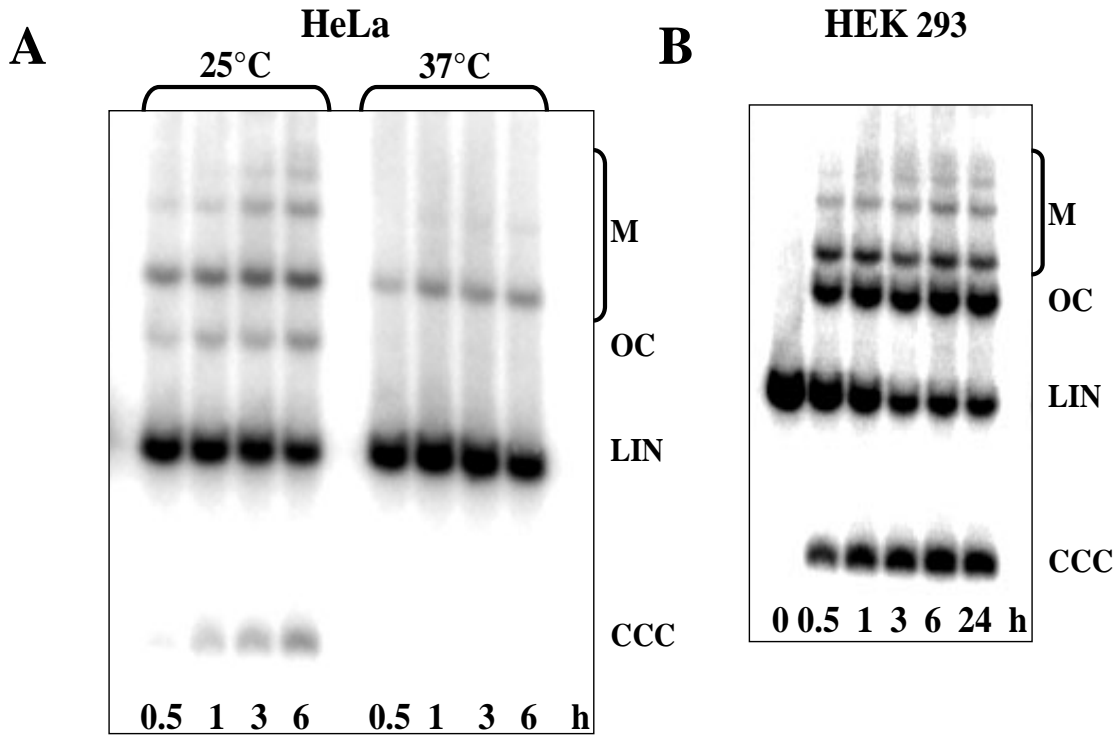
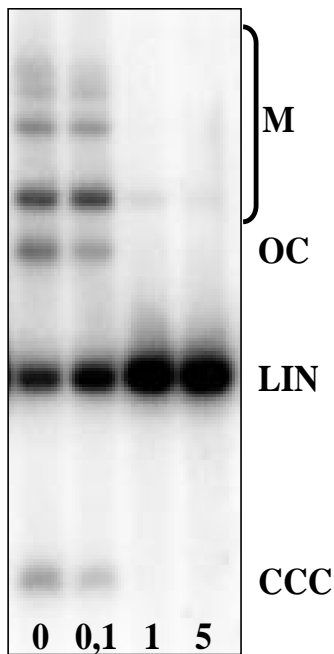


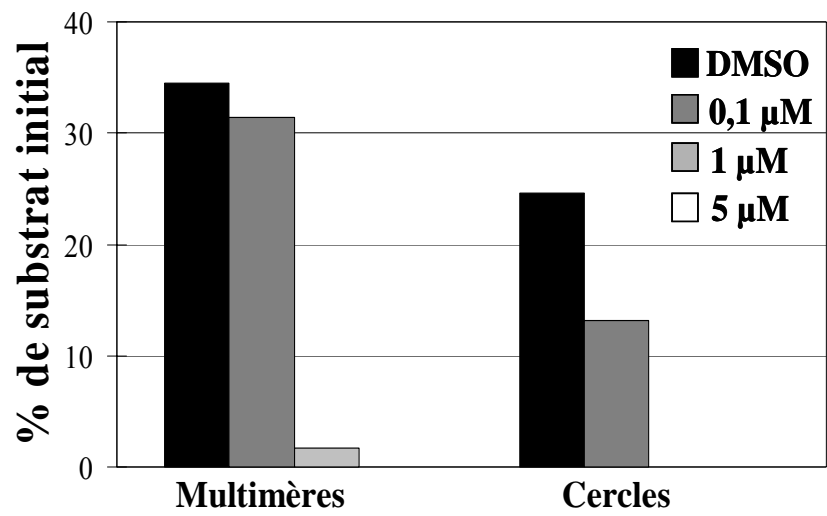
Figure 17: Cinétique de réparation NHEJ *in vitro*. 10 ng de substrat Bam/Asp (5'/5') est incubé en présence de (A) 16 µg d'extraits de cellules HeLa ou (B) 72 µg d'extraits de cellules HEK 293 pendant les temps indiqués au bas de chaque gel. Les produits sont analysés par *southern blotting* et imagerie phosphore.

A



Wortmannine (µM)

B



Wortmannine	0,1 µM	1 µM	5 µM
Multimères	91,2	4,9	0,0
Cercles	53,5	0,0	0,0

Figure 18: Sensibilité du système à la wortmannine. 48 µg d'extraits de cellules HeLa (7 µl) sont incubés 30 min sur glace avec des doses croissantes de wortmannine (0,1, 1 et 5 µM dans 1 µl de DMSO). Un volume équivalent de DMSO est utilisé comme contrôle. Puis 10 ng de substrat Pst et un tampon contenant les dNTP et l'ATP est ajouté. La réaction a lieu à 25°C pendant 6 h. (A) Analyse par *southern blotting* des produits de réparation. (B) Quantification par imagerie phosphore (logiciel ImageQuant). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du substrat initial (histogramme) ou en pourcentage du contrôle DMSO (tableau).

Résultats

C) Reproductibilité

J'ai analysé la reproductibilité du test *in vitro* dans des extraits de cellules HeLa préparés selon la méthode à petite échelle (Tableaux 5 et 6). Il ressort que les quantités mesurées, tant pour l'efficacité globale de réparation que pour la distribution entre produits circulaires et multimères, varient parfois dans un intervalle de 20% autour de leur valeur moyenne. De nombreux paramètres peuvent expliquer cette variabilité : conditions de culture des cellules, perte d'activité des extraits dans le temps...

Extrémités	Efficacité	Multimères	Cercles
5' cohésives	72 ± 2,6	50 ± 1,3	21 ± 3,7
3' cohésives	66 ± 0,4	35 ± 2,8	30 ± 2,5
franches	74 ± 3,9	40 ± 5,3	34 ± 8,3
5'/5'	74 ± 2,4	55 ± 2,7	20 ± 5,1
3'/3'	74 ± 2,7	42 ± 7,1	32 ± 7,8
5'/franche	70 ± 2,2	43 ± 8,6	27 ± 10,3
franche/3'	68 ± 2,7	41 ± 5,7	27 ± 7,5
5'/3'	59 ± 5,1	42 ± 3,4	17 ± 5,9

Tableau 5 : Variabilité du test NHEJ *in vitro* dans des extraits de cellules HeLa. Les valeurs correspondent à la moyenne et à l'écart type de trois réactions effectuées avec deux préparations d'extraits indépendantes. Elles sont exprimées en pourcentage de substrat initial.

Extrémités	Efficacité	Multimères	Cercles
3' cohésives	50 ± 5,4	29 ± 5,5	21 ± 3,9
3'/3'	61 ± 8,2	32 ± 7,1	29 ± 2,8
5'/franche	47 ± 10	32 ± 10,6	14 ± 3
franche/3'	42 ± 6,1	29 ± 6,2	13 ± 2,5
5'/3'	39 ± 8	29 ± 2,6	10 ± 0,6

Tableau 6 : Variabilité du test NEHJ *in vitro* dans des extraits de cellules HeLa « contrôle » (BD650). Les valeurs correspondent à la moyenne et à l'écart type de 7 ou 8 réactions effectuées avec trois préparations d'extraits indépendantes. Elles sont exprimées en pourcentage de substrat initial.

Résultats

Afin de prendre en compte cette variabilité, j'ai toujours comparé des extraits réalisés le même jour à partir de cellules mises en culture dans les mêmes conditions. J'ai inclus une lignée de référence (la lignée « contrôle » pour les expériences sur les clones KD) à chacune de mes préparations d'extraits afin d'avoir un contrôle interne de la qualité d'extraction. J'ai fixé le ratio ADN/protéine à 0,125 fmol d'ADN par μg de protéines (soit 10 ng d'ADN pour 40 μg de protéines). Les observations ont été confirmées par la répétition des réactions de NHEJ et la réalisation d'extractions indépendantes. Dans ces conditions, les différences entre lignées sont conservées d'une expérience à l'autre.

D) Sensibilité à la wortmannine

La wortmannine est un inhibiteur des kinases de la famille PIKK dont fait partie la DNA-PKcs. La pré-incubation des extraits protéiques par des quantités croissantes de wortmannine inhibe la réaction de NHEJ (Figure 18). L'inhibition est quasi-totale à la concentration de 1 μM , ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec d'autres protocoles de NHEJ *in vitro* dans des extraits de cellules lymphoblastoïdes humaines ou de cellules HeLa (Baumann and West, 1998; Wang et al., 2003). L'inhibition de l'activité kinase de la DNA-PKcs empêche en particulier son autophosphorylation, ce qui conduit au blocage de la DNA-PKcs aux extrémités d'ADN (Calsou et al., 1999; Merkle et al., 2002; Weterings et al., 2003). La sensibilité à la wortmannine du test utilisé ici semble donc indiquer que la voie NHEJ dépendant de DNA-PK y est prépondérante. A 0,1 μM de wortmannine, les produits circulaires sont diminués de moitié alors que les multimères ne baissent que de 10% (Figure 18B). La re-circularisation du substrat serait donc plus fortement dépendante de l'activité du complexe DNA-PK. Cette sensibilité plus importante des produits circulaires à la wortmannine a été observée par d'autres (Pfeiffer et al., 2006).

2. La protéine kin17 n'a pas d'influence sur le NHEJ *in vitro*

La protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ est recrutée sur les structures nucléaires après traitement par des agents induisant des DSB et/ou un blocage des fourches de réplication (Article III). Une réduction du niveau de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ entraîne une augmentation de la radiosensibilité des cellules RKO (Article II). De plus, la protéine kin17 purifiée présente une affinité préférentielle pour l'ADN courbe, en particulier celui trouvé aux sites de recombinaison illégitimes (Mazin et al., 1994a; Mazin et al., 1994b). Nous avons émis l'hypothèse que la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ pourrait être impliquée dans la réparation dite illégitime des DSB. Afin d'étudier l'influence éventuelle de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ dans le NHEJ, j'ai utilisé différentes approches.

A) Addition d'anticorps dirigés contre la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$

L'addition d'une quantité croissante d'anticorps dirigés contre la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ dans des extraits de cellules HeLa n'influence pas la réaction de NHEJ (Figure 19A). L'anticorps Ig K58 reconnaît un épitope situé dans le corps de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$, au niveau de la région homologue à la protéine bactérienne RecA. L'anticorps Ig K36 est dirigé contre l'extrémité C-terminal de la protéine et reconnaît un épitope situé dans le domaine KOW. Rien ne permet d'affirmer que les anticorps utilisés sont capables de bloquer les interactions éventuelles de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ avec l'ADN ou les protéines du NHEJ. Parmi les 80 hybridomes testés au laboratoire, aucun ne reconnaît l'extrémité N-terminale de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$, région contenant le doigt de zinc. En collaboration avec le service de Pharmacologie et d'Immunologie du CEA de Saclay, nous avons récemment obtenu un anticorps dirigé contre un fragment N-terminal de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ qu'il serait intéressant d'utiliser dans le test de NHEJ *in vitro*.

Résultats

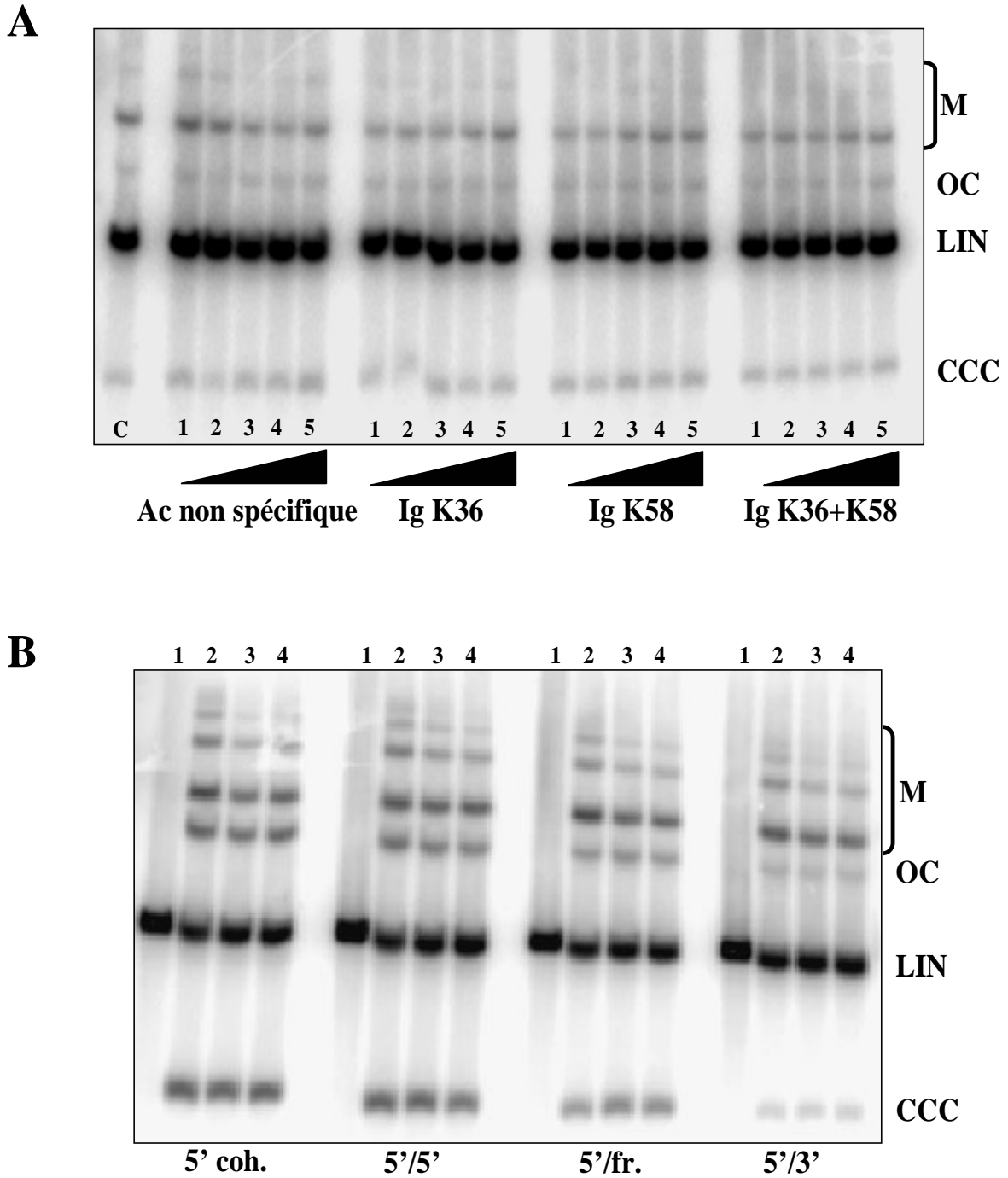


Figure 19: Effets de l'addition d'anticorps dirigés contre la protéine $_{HSA}kin17$ ou de protéine purifiée dans des extraits de cellules HeLa. (A) Avant la réaction de NHEJ *in vitro*, 12 μ g d'extraits de cellules HeLa sont pré-incubés 30 min avec des quantités croissantes d'anticorps dirigés contre la protéine $_{HSA}kin17$ (Ig K36 et/ou Ig K58). Des anticorps non spécifiques (dirigés contre la protéine du prion) et conservés dans le même tampon sont utilisés comme contrôle. C: réaction standard; 1: 0,1 ng; 2: 1 ng; 3: 10 ng; 4: 100 ng; 5: 1000 ng d'anticorps au total. (B) Avant la réaction de NHEJ *in vitro*, 21 μ g d'extraits de cellules HeLa sont pré-incubés 30 min avec 1,2 μ g de protéine $_{HSA}kin17$ purifiée. Une quantité équivalente de protéine dénaturée par chauffage est utilisée comme contrôle. 1: substrat initial (2 ng); 2: réaction standard; 3: protéine $_{HSA}kin17$ dénaturée; 4: protéine $_{HSA}kin17$.

Résultats

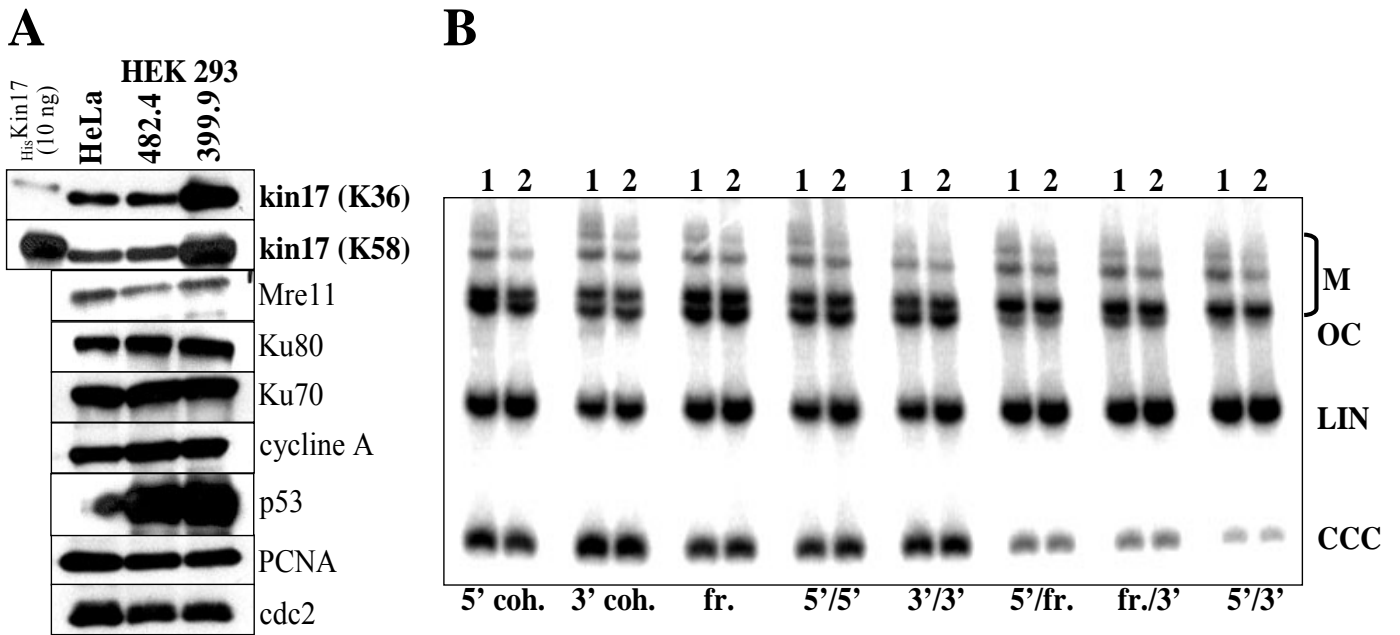


Figure 20: Activité NHEJ d'extraits de cellules HEK 293 sur-exprimant la protéine HSA kin17. (A) Analyse par *Western blot* du contenu protéique d'extraits de cellules HeLa, HEK 293 482.4 (pEBV) et HEK 293 399.9 (pEBVKIN17). L'équivalent de 10 μ g de protéines est séparé sur un gel de polyacrylamide. (B) Analyse par *southern blotting* des produits de réparation NHEJ dans des extraits de cellules HEK 293 482.4 (lignes 1) et 399.9 (lignes 2). 10 ng de substrat sont incubé 6 h à 25°C en présence de 40 μ g d'extraits protéiques.

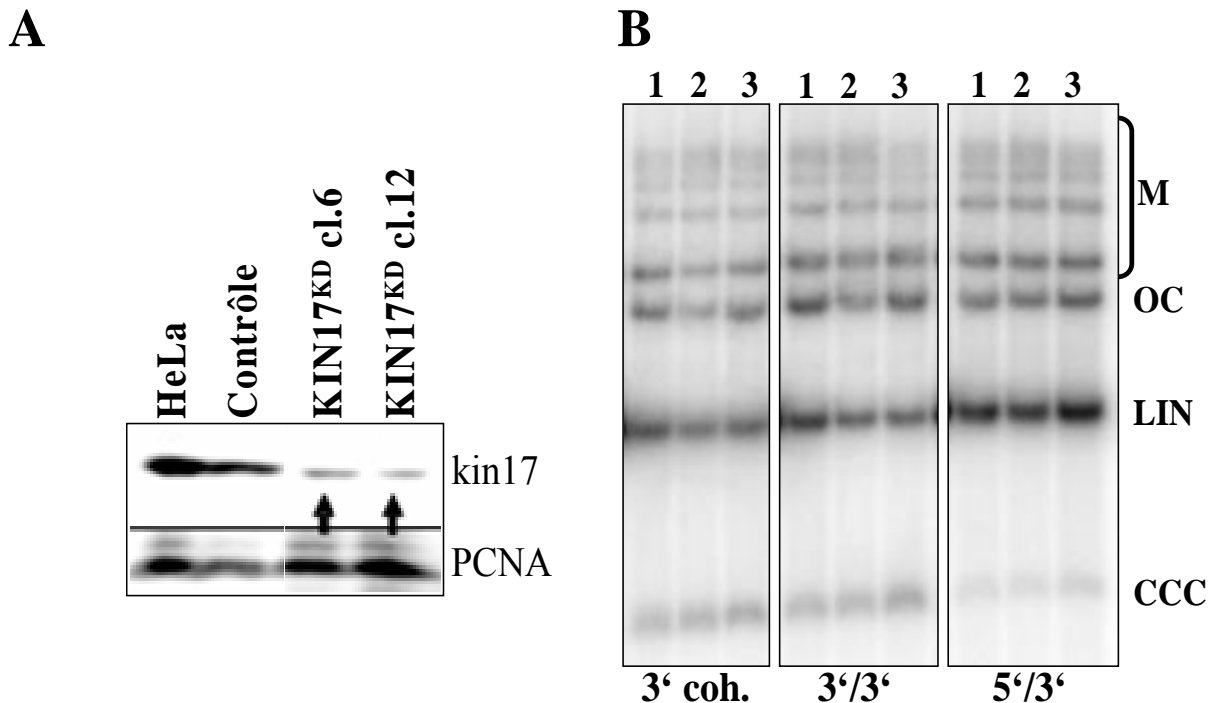


Figure 21: Effets d'une réduction de l'expression de la protéine HSA kin17 par interférence ARN sur le NHEJ *in vitro*. (A) Analyse par *Western blot* du contenu protéique de cellules HeLa, HeLa « contrôle » (pBD650) et KIN17^{KD} (pBD674). (B) Analyse par *southern blotting* des produits de réparation NHEJ dans des extraits de cellules HeLa contrôle (lignes 1), KIN17^{KD} clone 6 (lignes 2) et clone 12 (lignes 3). 10 ng de substrat est incubé 6 h à 25°C en présence de 40 μ g d'extraits protéiques.

Résultats

B) Addition de protéine kin17 recombinante purifiée

L'addition d'un excès de protéine $_{HSA}kin17$ recombinante purifiée dans des cellules d'insecte Sf9 dans des extraits de cellules HeLa n'a pas de conséquence sur la réaction de NHEJ (Figure 19B). Comme contrôle, j'ai utilisé une quantité équivalente de protéine kin17 purifiée dénaturée par chauffage. Cependant, la protéine kin17 n'ayant pas d'activité connue et testable, nous ne pouvons affirmer que la protéine kin17 purifiée dans des cellules d'insectes conserve la structure et les propriétés de la protéine $_{HSA}kin17$ endogène.

C) Extraits de cellules humaines sur-exprimant la protéine $_{HSA}kin17$

Afin de s'affranchir des biais inhérents à l'utilisation de protéine recombinante purifiée, j'ai testé l'activité NHEJ d'extraits de cellules humaines sur-exprimant la protéine $_{HSA}kin17$ de façon exogène. Comme cité précédemment, les cellules de la lignée HEK 293 tolèrent l'expression ectopique de la protéine $_{HSA}kin17$ sur le long terme (clone HEK 293 399.9, vecteur pEBV portant l'ADNc du gène $_{HSA}KIN17$). L'analyse par *Western blot* confirme que le niveau de protéine $_{HSA}kin17$ est plus élevé dans les cellules HEK 293 399.9 que dans des cellules contrôle transfectées par un vecteur pEBV vide (clone HEK 293 482.4) qui présentent un niveau comparable à la lignée HeLa (Figure 20A). De plus, la modification du niveau de protéine $_{HSA}kin17$ n'affecte pas l'expression de gènes de la réparation des DSB comme Ku70, Ku80 ou Mre11, pas plus que l'expression du PCNA ou de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire comme la cycline A ou la protéine p34^{cdc2}.

Aucune différence significative dans l'activité NHEJ n'est observée entre les clones 482.4 et 399.9 (Figure 20B). L'utilisation de ces mêmes cellules dans un test de réplication *in vitro* a permis de mettre en évidence une réduction de l'activité de réplication dans la lignée sur-exprimant la protéine $_{HSA}kin17$ (Miccoli et al., 2002).

Résultats

D) Extraits de cellules humaines présentant un niveau réduit de protéine $HSAkin17$

J'ai analysé l'activité de NHEJ *in vitro* de deux clones HeLa KIN17^{KD} (décrits dans l'article IV). Ces clones présentent un niveau réduit de protéine $HSAkin17$ comme en témoigne l'analyse par *Western blot* (Figure 21A). Cependant, aucune différence significative n'est décelée entre le profil de réparation des extraits de cellules « contrôle » et ceux des extraits de cellules KIN17^{KD} (Figure 21B).

Cette série d'expériences montre que la protéine $HSAkin17$ a peu ou pas d'influence sur la réparation NHEJ. Il est cependant intéressant de noter que notre système d'ARNi n'a pas de conséquences collatérales sur la capacité NHEJ des cellules transfectées.

Article V

L’extinction à long terme du gène *XPC* affecte la réparation des cassures double-brin de l’ADN dans les cellules HeLa. E. Despras, P. Pfeiffer, B. Salles, P.

Calsou, S. Kuhfittig-Kulle, J.F. Angulo D.S.F. Biard. Soumis.

Dans des cellules de hamster ou des cellules humaines déficientes en NER, les lésions UV non réparées peuvent être converties en DSB par un mécanisme dépendant de la réplication (Halicka et al., 2005; Squires et al., 2004). L’analyse génomique fonctionnelle de souris transgéniques exprimant une photolyase spécifique des CPD a montré que la source de ces cassures était vraisemblablement des CPD non réparés. Leur conversion en DSB active des voies de signalisation et de réparation des DSB (Garinis et al., 2005). Ce résultat pose la question de l’implication des DSB dans la toxicité des UV. Un défaut de réparation des DSB n’est pas une caractéristique attendue des cellules déficientes en NER. Cependant, une lignée XP-G (XP3BR) et une lignée XP-C (XP14BR) présentent une sensibilité aux RI (Arlett et al., 1980; Arlett et al., 2006). Il nous a donc semblé intéressant de comparer les capacités de réparation des DSB de cellules proficientes et déficientes en NER.

Nous avons utilisé le système d’ARNi décrit dans l’article IV pour cibler des protéines du NHEJ (XRCC4 et DNA-PKcs), la voie majeure de réparation des DSB chez les mammifères. Nous disposons ainsi de clones issus de la lignée HeLa et présentant un défaut de la voie NHEJ ou du NER. Pour la première fois, nous avons analysé dans un contexte syngénique les relations entre ces deux voies supposées indépendantes et nous avons comparé leur implication dans la survie des cellules humaines.

1. Obtention de cellules HeLa déficientes en NHEJ.

La diminution de l'expression des gènes *XRCC4* et *DNA-PKcs* par transfection de vecteurs pEBV-siRNA (cellules *XRCC4*^{KD} et *DNA-PKcs*^{KD}) permet d'instaurer dans les cellules HeLa une sensibilité à divers agents induisant des DSB comme les RI, la néocarzinostatine (NCS) ou l'étoposide (VP16). Cette augmentation de sensibilité est corrélée avec une diminution de 75% de l'efficacité du NHEJ mesurée dans le système *in vitro* présenté à la section précédente.

2. Les cellules *XPC*^{KD} sont sensibles à l'induction de DSB par le VP16.

Contrairement aux cellules *XRCC4*^{KD} et *DNA-PKcs*^{KD}, les cellules *XPA*^{KD} et *XPC*^{KD} ne sont pas sensibles aux RI et à la NCS comme le montre des expériences de croissance clonogénique. Cependant, les cellules *XPC*^{KD} présentent une sensibilité modérée au VP16. Alors que l'action de la NCS est directe, le VP16 produit des DSB via un mécanisme dépendant de la réplication de l'ADN.

3. Les cellules *XPC*^{KD} présentent une intolérance aux doses aiguës de RI

Nous avons analysé l'effet des vecteurs pEBV-siRNA (5 jours après transfection ou dans des clones KD stables) sur le cycle cellulaire de cellules HeLa 24 h après une dose aiguë d'UVC (10 J/m²) ou de rayons γ (6 Gy).

Dans les cellules *XPA*^{KD} et *XPC*^{KD}, les UVC entraînent une accumulation des cellules en phase S. Ceci suggère que les dommages UV non réparés bloquent les fourches de réplication, ce qui empêche la progression dans le cycle cellulaire. 24 h après irradiation à 6 Gy, les

Résultats

cellules XPC^{KD} présentent un blocage significatif en phase G2. Dans les mêmes conditions, la grande majorité des cellules du clone DNA-PKcs^{KD} analysé sont retrouvées dans cette phase du cycle cellulaire, ce qui indique qu'il pourrait s'agir de cellules endommagées. Une telle modification du cycle cellulaire n'est pas observée dans les cellules « contrôle » et XPA^{KD} après exposition aux rayons γ .

Ces résultats, couplés à l'absence de radiosensibilité observée à des doses plus faibles de rayons γ , suggèrent que les cellules déficientes en protéine XPC peuvent tolérer un niveau réduit de dommages induits par les RI mais ne peuvent pas prendre en charge des quantités plus élevées.

4. Le NHEJ *in vitro* est altéré dans les cellules XPC^{KD}.

Les extraits de trois clones XPC^{KD} présentent un spectre de réparation NHEJ altéré avec une diminution de 50% de la formation de produits circulaires et, selon le clone analysé, une diminution de l'efficacité globale du NHEJ. L'absence de modification de l'activité NHEJ dans des extraits de cellules KIN17^{KD} et XPA^{KD} par rapport aux extraits de cellules « contrôle » indique que cette altération n'est pas une conséquence du processus d'établissement de l'ARNi ou du test NHEJ.

5. Le recrutement des protéines XRCC4 et ligase IV sur les structures nucléaires endommagées intervient à des doses plus faibles de DSB dans les cellules XPC^{KD}.

Des expériences de fractionnement après traitement à la calicheamicine (CAL), un inducteur très spécifique de DSB, montrent que les protéines XRCC4 et ligIV sont recrutées sur les structures nucléaires à des doses plus faibles de CAL dans les cellules XPC^{KD} et DNA-PKcs^{KD} que dans les autres clones analysés. Il convient toutefois de noter que les doses

Résultats

de CAL utilisées dans cette approche restent très élevées et incompatibles avec la survie cellulaire.

6. La formation massive de DSB entraîne une diminution de la quantité de protéine XPC.

Le traitement par des doses élevées de CAL, de NCS ou de VP16 entraîne une réduction dépendant de la dose de la quantité de protéine XPC ancrée sur les structures nucléaires. Cette réduction est associée à une baisse du taux protéique total de XPC.

Hypothèse :

Les différences d'activité NHEJ *in vitro* et de sensibilité au VP16 des cellules XPA^{KD} et XPC^{KD} laissent à penser que la protéine XPC pourrait influencer d'autres voies de réparation en dehors de son rôle abondamment étudié dans le NER. A l'heure actuelle, nous cherchons à déterminer si son influence sur le NHEJ est directe ou indirecte. La protéine XPC présentant une affinité pour les distorsions de la double hélice d'ADN, il est possible qu'elle soit requise pour la prise en charge de certains dommages (complexe ADN/TopoisoméraseII/VP16) ou d'intermédiaires de réparation des DSB. Cependant, en accord avec de nombreux auteurs, nous privilégions l'hypothèse que la protéine XPC pourrait jouer un rôle plus global et participer à la régulation de la réponse aux dommages de l'ADN.

LONG-TERM *XPC* SILENCING AFFECTS DNA DOUBLE-STRAND BREAK REPAIR IN HELa CELLS

Emmanuelle Despras¹, Petra Pfeiffer^{2,3}, Bernard Salles⁴, Patrick Calsou⁴, Steffi Kuhfittig-Kulle^{2,5}, Jaime F. Angulo¹ and Denis S.F. Biard¹

(1) Commissariat à l'Energie Atomique, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, Département de Radiobiologie et de Radiopathologie, Direction des Sciences du Vivant, Fontenay-aux-Roses 92265, France. (2) Institute for Genetics, Dept. of Biology and Geography of the University of Duisburg-Essen, Universitätsstr. 5, D-45117 Essen, Germany. (3) present address : Institute for Genetics, University of Cologne, Zùlpicher Str. 47, D-50674 Köln, Germany. (4) CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex 4, France. (5) present address: Pediatric haematology/oncology, Children's Hospital of Essen, Hufelandstr. 55, D-45122 Essen, Germany.

Running title: *XPC* gene silencing interferes with NHEJ

Key words: NHEJ, *XPC*, DNA DSB, RNA interference, EBV vectors

Correspondence: Emmanuelle Despras. CEA-DSV-DRR, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, BP 6, 92265 Fontenay aux Roses, France. Phone: 33 1 46 54 87 47. Fax: 33 1 46 54 87 34. e-mail: emmanuelle.despras@cea.fr.

Abbreviations: CAL, calicheamicin; CHO, Chinese hamster ovary; cl., clone; CPD, cyclobutane pyrimidine dimer; DSB, DNA double-strand break; EBV, Epstein-Barr virus; IR, ionizing radiation; KD, knock down; NCS, neocarzinostatin; NHEJ, non-homologous end joining; NER, nucleotide excision repair; RNAi, RNA interference; UV, ultraviolet; WCE, whole cell extracts; XP, xeroderma pigmentosum.

To study the relationships between different DNA repair pathways, we established a set of isogenic HeLa clones where one specific DNA repair gene was silenced using long-term RNA interference. We focus here on genes involved in either nucleotide excision repair (NER; *XPA* and *XPC*) or non-homologous end joining (NHEJ; *DNA-PKcs* and *XRCC4*). As expected, *XPA*^{KD} (*Knock Down*) and *XPC*^{KD} cells were highly sensitive to UVC. *DNA-PKcs*^{KD} and *XRCC4*^{KD} cells presented an increased sensitivity to various inducers of double-strand breaks (DSBs) and a 70% to 80% reduction of *in vitro* NHEJ activity. Surprisingly, long-term silencing of *XPC* gene expression led to an increased sensitivity to etoposide, a topoisomerase II inhibitor which creates DSBs through the progression of DNA replication forks. *XPC*^{KD} cells also showed intolerance toward acute γ -ray irradiation. We demonstrated that *XPC*^{KD} cells exhibited an altered spectrum of NHEJ products with decreased levels of intra-molecular joined products. Moreover, in both *XPC*^{KD} and *DNA-PKcs*^{KD} cells, *XRCC4* and ligase IV proteins were mobilized on damaged nuclear structures at

lower doses of DSB inducer. In *XPC*-proficient cells, *XPC* protein was released from nuclear structures after induction of DSBs. By contrast, silencing of *XPA* gene expression did not have any impact on sensitivity to DSB or NHEJ. Our results suggest that *XPC* deficiency, certainly in combination with other genetic defects, may contribute to impair DSB repair.

Xeroderma pigmentosum (XP) is a human disorder characterized by extreme sunlight sensitivity and markedly increased risk of skin cancer. XP cells exhibit a defect in nucleotide excision repair (NER), the major pathway for the removal of ultraviolet (UV)-induced and other helix-distorting lesions (1, 2). Seven XP complementation groups have been identified (XP-A to XP-G) with each gene product participating in one particular NER step. UV-induced lesions can also be bypassed by translesion DNA synthesis with polymerase η , whose mutations lead to a variant form of XP called XP-V (3, 4). It was proposed that, in XP-V cells, collapse of replication forks stalled by UV-induced lesions can form DNA double-strand breaks (DSB) repaired via recombination-based pathways (5). Such a

replication-dependent conversion of unrepaired UV-induced lesions into DSBs was also observed in Chinese hamster ovary (CHO) and human cells devoid of NER (5-7). The source of these DNA breaks is likely to be unrepaired cyclobutane pyrimidine dimers (CPD). Their conversion into DNA breaks activates protein networks involved in DSB signaling and repair, as evidenced by functional genomic analysis of CPD-specific photolyase transgenic mice (8). Such a result raises the question of the impact of DSBs in the cytotoxicity of UV-light. A defect in DSB repair would not be awaited as a characteristic of XP cells. However, it has been reported that one XP-G (XP3BR) and one XP-C cell line (XP14BR) elicited an impaired response to ionizing radiation (IR) (9, 10). It appears then interesting to compare the DSB repair capacity of NER-proficient and NER-deficient cells.

Non-homologous end joining (NHEJ) is the major mechanism of DSB repair in mammalian cells. Contrary to homologous recombination, it requires no homology to rejoin two DNA ends. Biochemical and genetic studies led to the following model for the main NHEJ pathway (for review see 11): (i) binding of the Ku70/Ku80 (Ku) heterodimer to DNA ends; (ii) recruitment and activation of the DNA-PKcs kinase in a complex with Artemis; (iii) processing of DNA ends; (iv) ligation by DNA ligase IV (LigIV) associated with XRCC4 and presumably Cernunnos-XLF (12, 13). In addition, some studies suggest the existence of secondary pathways that occur in DNA-PK-deficient cells and could involve PARP-1, XRCC1 and DNA ligase III (14, 15).

Because the comparison of XP cells derived from patients is delicate due to their different genetic backgrounds, we developed a human syngeneic XP-model based on RNA interference (RNAi). Epstein-Barr virus (EBV)-derived plasmids carrying sequences coding for small interfering RNA (pEBVsiRNA) were used to stably introduce NER defects in HeLa cells (16, 17). We targeted XPA and XPC proteins, the two NER proteins involved in lesion recognition. We characterized different knock-down (KD) HeLa clones (XPA^{KD} and XPC^{KD}) which remained stable for more than 400 days under hygromycin B selection. These clones exhibit undetectable levels of either XPA or XPC protein and present the main features of the XP phenotype (UVC sensitivity and impaired UDS) (16). Here, we silenced the expression of *DNA-PKcs* and *XRCC4* genes (*DNA-PKcs*^{KD} and *XRCC4*^{KD} clones) to create a model of NHEJ deficiency in HeLa cells. Both *in vitro* and *in vivo* experiments showed that XPC^{KD} cells, unlike XPA^{KD} cells, presented an altered NHEJ activity. XPC^{KD} cells exhibited an enhanced

sensitivity to etoposide and intolerance to acute doses of γ rays, although not sensitive to lower doses of IR. Therefore, in a HeLa genetic background, XPC deficiency could hamper DSB repair, certainly in combination with other genetic factors.

MATERIAL AND METHODS

In accordance with the quality management program of our department, this work is reported in custom laboratory books numbered CEA/DRR/SRBF/LGR/ 0760, 3090, 3191, 4658, 4659, 6093 and 6094.

siRNA design and cloning in pEBV-based siRNA vectors

Vectors, cloning strategies and establishment of KD HeLa clones were described elsewhere (16, 17). Short hairpin RNA (shRNA) coding sequences were designed with siSearch software (<http://sirna.cgb.ki.se/>) including minor change (18) and synthesized by Proligo (Sigma). Control cells were obtained by transfection with vector pBD650 (16), which carries a shRNA harboring two mismatches in one strand of the hairpin structure. RNAi sequences for *DNA-PKcs* (NM-006904; pBD743 plasmid): nucleotides 5980 to 5998; *XRCC4* (NM_022550; pBD694): nucleotides 674 to 692; *XPC* (NM_004628; pBD634): nucleotides 267 to 285; *XPA* (NM_000380; pBD695): nucleotides 587 to 605; *KIN17* (NM_012311; pBD674): nucleotides 180 to 198.

Irradiation and chemicals

Cells were irradiated using a ¹³⁷Cs γ -ray source (IBL 637 CisBio International) at a dose rate of 1.9 Gy/min. Neocarzinostatin (kindly provided by Dr. L. Deriano, CEA, France), calicheamicin (kindly provided by Dr. P. Hamann, Wyeth Research, New York, USA) and both etoposide (Vépéside-Sandoz) and L-mimosine (Sigma) were diluted in ice-cold 10 mM phosphate buffer (pH 6.6), -20°C ethanol and sterile distilled water, respectively, prior to cell treatment. Equal volumes of solvents or buffers were added to untreated cells as a control. Wortmannin (Sigma) was diluted in DMSO.

Cell culture

HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin under 5% CO₂. KD clones were grown in presence of 125 μ g/ml hygromycin B (Invitrogen). For clonogenic cell growth, cells were irradiated or

incubated with NCS and VP16 for 1 and 6 hours, respectively, 14 days before fixation.

For transient transfection experiments, HeLa cells were trypsinized 72 h after transfection with 2 μ g of plasmid and grown under hygromycin B selection for 48 h before irradiation. Gene silencing efficiency was checked by immunocytochemical stainings (data not shown).

Western blot and immunostaining

Procedures were described elsewhere (19). We used monoclonal antibodies directed against Ku80 (clone 111), Ku70/80 (clone 162), DNA-PKcs (clone 18.2) (Neomarkers), γ -H2AX (Upstate) and human kin17 protein (Ig K36 and Ig K58) (19); rabbit polyclonal antibodies directed against XRCC4 (Serotec Ltd.) and LigIV (Abcam Ltd.); mouse polyclonal antibody directed against XPC obtained after inoculation of a purified fragment of human XPC protein (CEA-LGR; E. Renaud, article in preparation).

Flow cytometry

Procedure was described elsewhere (16). Briefly, cells were collected by trypsinization and fixed in 75% ethanol. Nuclear DNA was stained with propidium iodide (Sigma; 4 μ g/ml) in the presence of RNase (Sigma; 10 μ g/ml) in PBS. 10,000 cells gated as single cells using FL2A/FL2W scatter were analyzed on a FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) using CellQuest software.

DNA-PKcs activity

Pull-down assay was carried out as already described (20). 25 μ g of protein extracts were mixed with 5 mg of dsDNA-cellulose (Amersham). Bound proteins were incubated with 4 nmol of DNA-PK peptide substrate (Promega) in presence of ATP and [γ -³²P]ATP for 10 min at 30°C. The identical reaction devoid of substrate was used as a negative control. As a positive control, we used 50 U of purified DNA-PKcs (Promega) activated by addition of 5 mg dsDNA-cellulose. [γ -³²P]ATP incorporation into peptide substrate was measured by liquid scintillation.

In vitro NHEJ assay

Whole cell extracts and DNA substrates were prepared and *in vitro* NHEJ assays were carried out as described elsewhere (21-23). Substrates were generated using following restriction enzymes: PstI (3'-cohesive ends), SmaI (blunt ends), BstXI (3'/3'), AvaI/HincII (5'/blunt), SmaI/PstI (blunt/3'), BamHI/PstI (5'/3'). Extracts were dialysed against reaction buffer (50 mM

3-(N-morpholino)-2-hydroxypropane sulfonic acid (MOPSO)-NaOH pH 7.5, 40 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM β -mercaptoethanol) prior to NHEJ assay. Standard reactions took place in a total volume of 10 μ l containing 8 μ l of extracts (40 μ g of proteins), 1 μ l of substrate (10 ng) and 1 μ l of 10x LNB buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM β -mercaptoethanol, 10 mM ATP pH 7, 2 mM dNTPs (0.5 mM each), 0.5 mg/ml BSA). For wortmannin inhibition experiments, 7 μ l of HeLa cell extracts (48 μ g of proteins) were incubated with 1 μ l of wortmannin for 30 min on ice prior to addition of 1 μ l of substrate and 1 μ l of LNB 10x buffer. Samples were incubated at 25°C for 6 h. Reactions were stopped and an equivalent of 2 ng of DNA substrate was deproteinized, electrophoresed on 1% agarose gels containing 1 μ g/ml ethidium bromide and submitted to Southern blotting. Reaction products were quantified by phosphorimaging (Storm SystemTM and ImageQuant software 5.0, Amersham Biosciences). For each NHEJ reaction, the intensity of a band was normalized to the total radioactivity loaded in the lane. NHEJ efficiency was assessed as the conversion of monomeric linear substrate into multimers and circular products, all expressed as a percentage of input substrate.

Biochemical fractionation

Cells were treated with the indicated doses of calicheamicine or neocarzinostatin for 1 hour. For etoposide treatment, asynchronous cells were treated for 4 or 24 h or synchronized in S phase by treatment with 400 μ M L-mimosine for 24 h followed by drug withdrawal and 6-h incubation prior to 1-h VP16 treatment. Cell fractionation was carried out as already described (24). Briefly, P2 fraction was obtained after extraction with 0.1% Triton X-100 (15 min on ice) followed by RNase digestion (30 min at 25°C). For whole cell extracts (WCE), cells were resuspended in extraction buffer devoid of Triton X-100. Proteins were denatured by boiling in Laemmli buffer and volumes equivalent to the same quantity of cells were submitted to Western blotting.

RESULTS

Establishment of NHEJ-deficient HeLa cells

We have recently characterized isogenic clones where the expression of XPA or XPC gene has been silenced for a long time in culture (16). HeLa clones stably expressing shRNA sequences directed against either DNA-PKcs or XRCC4 mRNA were termed DNA-PKcs^{KD} and XRCC4^{KD}, respectively. Remarkably, DNA-PKcs^{KD} cells displayed quasi

undetectable levels of DNA-PKcs protein as evidenced by immunocytochemical staining and Western blotting (Figures 1A, 4C and 5A). We assessed the DNA-PKcs kinase activity in control and DNA-PKcs^{KD} cell extracts using a standard pull-down assay (Figure 1B). DNA-PKcs^{KD} cells displayed a nearly total loss of the endogenous DNA-PKcs kinase activity, which was close to background levels (Figure 1B, lane 6). Purified DNA-PKcs was used as a positive control (Figure 1B, lane 3). Presumably because XRCC4 protein is essential for cell life, all isolated XRCC4^{KD} clones displayed residual levels corresponding to 10% to 15% of the control level (Figure 1C and data not shown). This remaining XRCC4 level allowed cell survival but dramatically hampered DSB repair as shown below. As expected, both DNA-PKcs^{KD} and XRCC4^{KD} cells elicited a markedly increased sensitivity towards IR, being 12- and 5-fold more sensitive than control cells at 2 Gy, respectively (Figure 1D).

We next analyzed the NHEJ activity of DNA-PKcs^{KD} and XRCC4^{KD} whole cell extracts as previously reported (22). Extracts from control cells yielded a variety of products comprising linear multimers (inter-molecular joining, M) and circular monomers (intra-molecular joining) occurring in the form of open circles (OC) and covalently-closed circles (CC) (Figure 2A, lanes 1). By contrast, DNA-PKcs^{KD} and XRCC4^{KD} cell extracts presented a 70% to 80% reduction in NHEJ efficiency, depending on DNA end configuration, as shown by phosphorimager quantification (Figure 2A and Table 1). In DNA-PKcs^{KD} extracts, both inter- and intra-molecular joinings were reduced to 30% of the level in control cell extracts (Table 1). In XRCC4^{KD} extracts, multimer formation was decreased to 30% of the level in control cell extracts whereas circular products were undetectable. This result indicates that the reduction of XRCC4 protein expression was sufficient to completely abolish re-circularization of the substrates. We found that pre-incubation of HeLa cell extracts with 1 μ M wortmannin, an inhibitor of DNA-PKcs kinase activity, quasi completely abolished NHEJ activity (Figure 2B). This is in agreement with previously reported results in various cell lines (25-27).

These compelling data show that the reduction in either DNA-PKcs or XRCC4 protein levels by pEBVsiRNA plasmids led to an increased radiosensitivity in HeLa cells correlated with a significant decrease of NHEJ activity. Moreover, the reduced NHEJ efficiency of DNA-PKcs^{KD} and XRCC4^{KD} cell extracts and NHEJ-proficient cell extracts pre-treated with wortmannin confirmed that

the DNA end joining observed in this cell-free system is indeed dependent on both DNA-PKcs and XRCC4. In these conditions, long term RNAi-based gene silencing allowed us to obtain a model of NHEJ deficiency in HeLa cells in agreement with the biochemical deficiencies reported previously for mutant CHO cells or DNA-PKcs-deficient M059J human cells (28, 29).

Differential sensitivity of NER- and NHEJ-deficient cells to DSB induction

Isogenic KD cells provided a unique opportunity to compare their sensitivity to various inducers of DSB. NHEJ- and NER-deficient HeLa cells were irradiated with γ rays or treated with two chemicals that induce DSBs either directly (neocarzinostatin: NCS) (30) or via a replication-dependent mechanism (etoposide: VP16) (31).

In addition to their sensitivity to IR (Figure 1D), DNA-PKcs^{KD} cells exhibited a marked sensitivity to NCS (Figure 3A). At 1 nM NCS, DNA-PKcs^{KD} cells were 14-fold more sensitive than control cells, with a survival of $1.5\% \pm 1.3$ and $21\% \pm 1.5$, respectively. Both XPA^{KD} and XPC^{KD} cells presented sensitivities similar to that of control cells after exposure to IR or NCS (Figure S1 in Supplemental data).

DNA-PKcs and XRCC4 gene silencing sensitize HeLa cells to VP16 (Figure 3B). At 1 μ M, no DNA-PKcs^{KD} clones emerged from culture and only 0.5% survival was observed for XRCC4^{KD} cells, while 15% of control cells survived. Similar survival curves were reported for NHEJ-deficient DT40 chicken cells (32). XPA^{KD} cells behaved like control cells upon VP16 treatment. By contrast, XPC^{KD} cells presented a mild sensitivity to VP16 with 2.5- and 7-fold higher sensitivity when compared to control cells at 0.5 and 1 μ M, respectively (Figure 3B).

XPC^{KD} cells showed intolerance to acute γ -ray irradiation

The cell cycle progression of KD cells 24 h after acute UVC (10 J/m^2 , 254 nm) or γ -ray (6 Gy) irradiation was analyzed by flow cytometry. When HeLa cells transiently transfected with pEBVsiRNA plasmids directed against XPA or XPC mRNA were exposed to UVC, they presented a tremendous S-phase blockage in comparison to cells transfected with control plasmid (Figure 3C). That revealed that unrepaired UVC-induced lesions blocked DNA replication and cell cycle progression. In HeLa cells, 6-Gy irradiation only triggered a slight G1 arrest and a moderate G2 blockage 24 h after exposure as described elsewhere (33). Strikingly, in the XPC^{KD} cell population we observed a prominent G2-phase arrest, which was detected at a lower extent in XPA^{KD}

cells. These accumulated G2-phase cells might represent damaged ones. As *DNA-PKcs* gene silencing is very deleterious in the first days of hygromycin B selection, we could not use it as a control in the aforementioned experimental conditions.

The effect of acute irradiation was also determined in stable KD clones. IR led to a major G2-phase blockage in *DNA-PKcs*^{KD} cells (Figure 3D). On the contrary, in these NER proficient cells, UVC-induced lesions were removed without hampering progression of DNA replication. In *XPA*^{KD} and *XPC*^{KD} cells, we observed the expected S-phase blockage 24 h after 10 J/m² UVC. Interestingly, we also detected a significant G2-phase blockage in *XPC*^{KD} after IR. A minor G2-phase arrest was detected in *XPA*^{KD} cells as compared to control cells.

These results show that transient and stable *XPC* gene silencing triggered intolerance to acute doses of IR. The absence of radiosensitivity as judged by clonogenic cell survival suggests that *XPC*^{KD} cells may deal with damage produced by lower doses of γ rays.

In vitro NHEJ was altered in *XPC*^{KD} cell extracts

To further explore the differences between *XPA*^{KD} and *XPC*^{KD} cells towards DSB-inducing agents, we analysed their NHEJ capacity. Two independent extract preparations (P1 and P2) were made for control, *XPA*^{KD} clone 6 (cl.6) and *XPC*^{KD} cl.21. For each cell line, P1 and P2 led to similar repair patterns (Figure 4A). *XPA*^{KD} cl.6 and *XPC*^{KD} cl.21 extracts presented NHEJ efficiencies comparable to that of control cell extracts as shown by blot quantification (Table 1). Repair profiles from *XPA*^{KD} and control cell extracts did not show significant differences in the distribution between inter- and intra-molecular joining. In opposition, *XPC*^{KD} cl.21 presented a significant 2-fold reduction in circle formation (arrows in figure 4A). This decrease was apparently counterbalanced by an increase of multimerization. Extracts prepared from *XPC*^{KD} cl.4 (independent transfection experiment) and *XPC*^{KD} cl.24 gave similar results (Table 1, Figure S2 in Supplemental data). In *XPC*^{KD} cl.4, circle formation ranged from 55 to 75% of that of control cell extracts, whereas *XPC*^{KD} cl.24 extracts presented a statistically significant 2-fold reduction. Moreover, NHEJ efficiency dropped to 75% and 60% of that of control cells in *XPC*^{KD} cl.4 and cl.24, respectively, revealing that the defect in intra-molecular joining was not compensated by an enhancement of inter-molecular joining.

During this work, KD clones were regularly analyzed by immunochemical staining and Western

blotting. This confirmed that *XPA*^{KD} and *XPC*^{KD} clones presented quasi undetectable levels of XPA or XPC protein even after several months of culture (Figures 4B and 4C) (see also 16). *DNA-PKcs*^{KD} and *XRCC4*^{KD} cells also presented reduced levels of *DNA-PKcs* and *XRCC4* proteins, respectively (Figure 4C). Interestingly, no significant differences in NHEJ key protein amounts were detected in control, *XPC*^{KD} and *XPA*^{KD} cells. Only *XRCC4*^{KD} cells displayed a reduced LigIV level (Figure 4C, lane 3), in agreement with the stabilization of LigIV by *XRCC4* previously observed in CHO cells (34).

In order to confirm that the impaired NHEJ activity observed in *XPC*^{KD} clones was not a side effect of pEBVsiRNA plasmids, we prepared extracts from two *KIN17*^{KD} clones characterized previously (16). *Kin17* is a nuclear zinc-finger protein involved in DNA replication and in the cellular response to genotoxic stress (35, 36). All isolated *KIN17*^{KD} clones exhibited a strong but partial reduction of *kin17* protein level (Figure 4B). This residual amount is likely to be required for cell survival (16). NHEJ activity of *KIN17*^{KD} cell extracts was comparable to that of control cells (Figure 4D). The fact that control, *KIN17*^{KD} and *XPA*^{KD} cell extracts produced similar NHEJ repair patterns strongly argues that the phenotype observed in *XPC*^{KD} cells is a consequence of *XPC* gene silencing and not a bias effect of the RNAi procedure or the NHEJ assay.

Our results indicate that the long-term silencing of *XPC* gene in HeLa cells led to either a decrease of *in vitro* NHEJ efficiency or to a repair switch from intra- to inter-molecular junctions. This alteration was not correlated with any significant modification of the expression of proteins involved in the predominant NHEJ pathway.

Recruitment of XRCC4 and LigIV to damaged nuclear structures occurred at lower doses of calicheamicin in XPC^{KD} cells

Recently, it was shown that key NHEJ proteins are recruited to detergent-resistant nuclear structures (P2 fraction) after exposure to different DSB inducers (24). We tested whether this recruitment takes place normally in *XPC*^{KD} clones. Cells were treated with calicheamicin (CAL) as it is a potent and very specific DSB inducer (30).

Ku80 protein was recruited in a dose-dependent manner without noticeable differences between the tested cell lines. A dose-dependent recruitment of *DNA-PKcs* was also observed, except in *DNA-PKcs*^{KD} cells where *DNA-PKcs* was, as expected, hardly detected (Figure 5A and data not shown). We observed that *XRCC4* protein was phosphorylated and associated to nuclear structures in

a dose-dependent manner, as previously described for NCS (24). In control and XPA^{KD} cells, XRCC4 found in the P2 fraction was mostly unphosphorylated after 1 nM CAL, while phosphorylation was observed after 4 nM CAL. By contrast, in DNA-PKcs^{KD} cells and in XPC^{KD} cl. 21 and 24, phosphorylation had already occurred after 1 nM CAL. This was correlated with a recruitment of LigIV at this lower dose (Figure 5B). Moreover, in DNA-PKcs^{KD} cells the band corresponding to phosphorylated XRCC4 migrated further than in other cell lines, revealing a decreased level of phosphorylation (Figures 5A and 5B). It is noteworthy that the residual XRCC4 protein in XRCC4^{KD} cells was efficiently recruited and phosphorylated and was sufficient to recruit LigIV (Figure 5B).

Our data revealed a similar behavior of XPC^{KD} and DNA-PKcs^{KD} cells upon CAL treatment, LigIV and phosphorylated XRCC4 association to nuclear structures occurring at lower doses than in other clones.

DSB induction led to the degradation of XPC protein

XPC protein was found in the P2 fraction of untreated cells, suggesting a tight association of XPC with nuclear structures (Figure 5). Analysis of whole protein content revealed that XPC was degraded after 1-hour incubation with 500 nM NCS (Figure 5C). Both CAL and NCS treatments led to a dose-dependent decrease of XPC protein amount in the P2 fraction of control cells (Figure 5A and C). This reduction was also observed in XPA^{KD} and DNA-PKcs^{KD} cells after treatment with CAL (Figure 5A). DSB formation was assessed using an antibody directed against phosphorylated histone H2AX after NCS treatment of control cells (Figure 5C). The reduction of XPC level in the P2 fraction was correlated with the increase of H2AX phosphorylation. Similar results were obtained in asynchronous control cells treated with increasing doses of VP16 for 4 and 24 h and in S-phase synchronized control cells treated with VP16 for 1 h (Figure 5D). As a control, we used kin17 protein, which is tightly associated with chromatin and nuclear matrix (37). These data show that XPC protein is removed from nuclear structures after treatment with chemicals inducing DSB with a high specificity and via replication-dependent or independent mechanisms.

DISCUSSION

Recently, Arlett and collaborators described an unusual radiosensitive XP-C patient (10). They demonstrated that XPC deficiency is not directly

involved in the observed IR sensitivity but impaired XPC pathway could enhance it. We have previously shown that XPC silencing using pEBVsiRNA plasmids dramatically impedes HeLa cell growth during the first few weeks following transfection. In XPC^{KD} cells, hygromycin B withdrawal restores wild type XPC amount but cells remain significantly sensitive to UVC (16). These results suggest that XPC deficiency could trigger unwanted and irreversible genetic changes. That reinforced the idea that XPC could participate to other genetic events than NER. In the present study, we targeted DNA-PKcs and XRCC4, two essential proteins belonging to the NHEJ pathway. XRCC4 gene silencing is particularly interesting because no human cell line lacking the XRCC4 protein is available to date. Thus, we obtained stable HeLa clones harboring specific defects in either NER or NHEJ. For the first time, we analyzed, in a syngeneic background, the relationships between these two allegedly independent DNA repair pathways and compared their respective involvements in the survival of human cells.

We showed that XPC deficiency affected the cellular response to either UVC or IR as evidenced by flow cytometry analysis performed 24 h after an acute irradiation. This result was observed 5 days after transfection as well as in stable XPC^{KD} clones. Clonogenic cell survival showed that XPC^{KD} cells are sensitivity to UVC (as XPA^{KD} cells) (16) but not to γ rays at lower doses than those used in acute irradiation experiments. These data suggest that XPC^{KD} cells can tolerate moderate amounts of IR-induced DNA damage but cannot cope with elevated ones.

Interestingly, XPC^{KD} cells also presented a mild sensitivity to VP16 which requires DNA replication for induction of DSBs in contrast to IR or NCS. The enhanced sensitivity of DNA-PKcs^{KD} and XRCC4^{KD} cells to VP16 argue for an involvement of DNA-PK dependent NHEJ in the repair of the VP16-induced DSBs, which is in agreement with previously reported results (38). It is not yet clear how the complexes formed by the VP16-crosslink of topoisomerase II on DNA are processed to become substrates for DSB repair pathways. We assume that these complexes alter the topological structure of the DNA helix, which may activate DNA repair proteins such as XPC. In particular, it has been recently shown *in vitro* that XPC and XPA proteins can recognize small oligopeptides crosslinked to DNA, which are further excised by the NER machinery (39).

XPC^{KD} cells presented an impaired NHEJ activity as evidenced by *in vitro* assays which revealed decreased levels of intra-molecular junctions. To

date, the biological significance of multimerization *versus* circularization of DNA substrate is not fully understood. Intra-molecular joining was completely abolished in XRCC4^{KD} cells in spite of residual XRCC4 levels and correct mobilization of NHEJ proteins to damaged nuclear structures. This result argues for XRCC4 being a limiting factor in the NHEJ process, at least *in vitro*, and further supports previously reported results (40). However, radiosensitivity was not strictly correlated with the circularization capacity of cell extracts, since DNA-PKcs^{KD} cells were significantly more sensitive to IR than XRCC4^{KD} cells. XRCC4 phosphorylation and LigIV recruitment on nuclear structures occurred at lower doses of CAL in both XPC^{KD} and DNA-PKcs^{KD} cells. This similarity strengthens the data from cell-free NHEJ assays. XRCC4 is phosphorylated by DNA-PKcs *in vitro* but, to date, there is no direct evidence that this phosphorylation is important for DSB repair *in vivo* (41, 42), except for the fact that DSB-inducing agents such as X-rays promote XRCC4 phosphorylation (43). In DNA-PKcs^{KD} cells, the fraction of XRCC4 associated with nuclear structures after DSB induction was hypo-phosphorylated in comparison to control and XRCC4^{KD} cells. Our results indicate that XRCC4 phosphorylation is essential for DSB repair and cell survival and involves DNA-PKcs *in vivo*.

XPC^{KD} and XPA^{KD} clones presented very low levels of the target protein, as shown here and elsewhere (16, 17). However, XPA gene silencing did not modify HeLa cell response to DSBs. This suggests that the unexpected behavior towards DSBs observed in XPC^{KD} cells is due to an intrinsic characteristic of XPC, rather than being a consequence of NER deficiency. XPC was removed from nuclear structures after treatment with highly specific DSB inducers but the absence of XPC affected NHEJ and sensitized cells to VP16. Taken together, these data suggest that this removal could be a step of the cellular response to DSBs in HeLa cells. Many authors have postulated that XPC protein could act in broader cellular mechanisms than initiation of global genome-NER alone. First, its association with the centrosomal protein centrin 2 might couple NER to cell division (44). Reduced mRNA level of centrin 2 in a plant mutant is associated with UVC sensitivity, decreased NER efficiency and increased homologous recombination (45). In cisplatin-treated human cells, XPC defect affects transcription responses of many genes, including DNA DSB repair genes (46). Purified XPC-HR23B complex interacts with thymine DNA glycosylase, an initiator of base excision repair, and stimulates its activity (47). This result physically links XPC to a repair pathway

distinct from NER. Compared to wild-type or XPA-deficient mice, XPC-KO mice develop more spontaneous mutations and more tumors upon 2-acetylaminofluorene treatment (47-49). Furthermore, the absence of XPC leads to the formation of a mutational hot spot at a non-dipyrimidine site of the remaining p53 allele of Trp53^{+/-} mice that cannot be detected in the absence of XPA or CSA (50).

Our results strengthen the notion that the function of XPC protein goes beyond the initial step of NER. Because XPC deficiency could disrupt the cellular response to DSB inducers such as γ rays (in one XP-C patient-derived cell line) (10) or VP16 (our results in HeLa cells), XPC protein could act at a regulatory level. More broadly, our result emphasize the cross relationships between different DNA repair pathways. At present, we seek to improve this set of silenced clones devoted to study the interwoven pathways of DNA repair.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank E. Feldmann, A. Odersky and W. Goedecke for their advice on NHEJ assay. This work was supported by Electricité de France contract 8702. E. D. received fellowships from the Commissariat à l'Energie Atomique and the Ligue Nationale Contre le Cancer. P. P. received a grant (2002.108.1) from the Wilhelm Sander Stiftung für Krebsforschung.

REFERENCES

1. Friedberg, E. C. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*, *1*: 22-33, 2001.
2. Cleaver, J. E. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer*, *5*: 564-573, 2005.
3. Cordonnier, A. M., Lehmann, A. R., and Fuchs, R. P. Impaired translesion synthesis in xeroderma pigmentosum variant extracts. *Mol Cell Biol*, *19*: 2206-2211, 1999.
4. Lehmann, A. R. Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS Lett*, *579*: 873-876, 2005.
5. Limoli, C. L., Giedzinski, E., and Cleaver, J. E. Alternative recombination pathways in UV-irradiated XP variant cells. *Oncogene*, *24*: 3708-3714, 2005.
6. Dunkern, T. R. and Kaina, B. Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide

- excision repair-deficient Chinese hamster cells. *Mol Biol Cell*, *13*: 348-361, 2002.
7. Squires, S., Coates, J. A., Goldberg, M., Toji, L. H., Jackson, S. P., Clarke, D. J., and Johnson, R. T. p53 prevents the accumulation of double-strand DNA breaks at stalled-replication forks induced by UV in human cells. *Cell Cycle*, *3*: 1543-1557, 2004.
 8. Garinis, G. A., Mitchell, J. R., Moorhouse, M. J., Hanada, K., de Waard, H., Vandeputte, D., Jans, J., Brand, K., Smid, M., van der Spek, P. J., Hoeijmakers, J. H., Kanaar, R., and van der Horst, G. T. Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *Embo J*, *24*: 3952-3962, 2005.
 9. Arlett, C. F., Harcourt, S. A., Lehmann, A. R., Stevens, S., Ferguson-Smith, M. A., and Morley, W. N. Studies on a new case of xeroderma pigmentosum (XP3BR) from complementation group G with cellular sensitivity to ionizing radiation. *Carcinogenesis*, *1*: 745-751, 1980.
 10. Arlett, C. F., Plowman, P. N., Rogers, P. B., Parris, C. N., Abbaszadeh, F., Green, M. H., McMillan, T. J., Bush, C., Foray, N., and Lehmann, A. R. Clinical and cellular ionizing radiation sensitivity in a patient with xeroderma pigmentosum. *Br J Radiol*, *79*: 510-517, 2006.
 11. Hefferin, M. L. and Tomkinson, A. E. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)*, *4*: 639-648, 2005.
 12. Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S. P. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, *124*: 301-313, 2006.
 13. Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M. C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J. L., Hufnagel, M., le Deist, F., Fischer, A., Durandy, A., de Villartay, J. P., and Revy, P. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, *124*: 287-299, 2006.
 14. Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem*, *279*: 55117-55126, 2004.
 15. Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., and Iliakis, G. DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res*, *65*: 4020-4030, 2005.
 16. Biard, D. S., Despras, E., Sarasin, A., and Angulo, J. F. Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res*, *3*: 519-529, 2005.
 17. Biard, D. S. F. and Angulo, J. F. Long term RNA interference: toward a set of isogenic human deficient cells in DNA repair genes. *In*: B. R. Landseer (ed.), *New research on DNA repair*, Vol. in press: Nova Science Publishers, Inc., 2006.
 18. Chalk, A. M., Warfinge, R. E., Georgii-Hemming, P., and Sonnhammer, E. L. siRNAdb: a database of siRNA sequences. *Nucleic Acids Res*, *33*: D131-134, 2005.
 19. Biard, D. S., Miccoli, L., Despras, E., Frobert, Y., Creminon, C., and Angulo, J. F. Ionizing radiation triggers chromatin-bound kin17 complex formation in human cells. *J Biol Chem*, *277*: 19156-19165, 2002.
 20. Finnie, N. J., Gottlieb, T. M., Blunt, T., Jeggo, P. A., and Jackson, S. P. DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*: 320-324, 1995.
 21. Daza, P., Reichenberger, S., Gottlich, B., Hagmann, M., Feldmann, E., and Pfeiffer, P. Mechanisms of nonhomologous DNA end-joining in frogs, mice and men. *Biol Chem*, *377*: 775-786, 1996.
 22. Pfeiffer, P., Feldmann, E., Odersky, A., Kuhfittig-Kulle, S., and Goedecke, W. Analysis of DNA double-strand break repair by nonhomologous end joining in cell-free extracts from mammalian cells. *Methods Mol Biol*, *291*: 351-371, 2005.
 23. Pfeiffer, P., Thode, S., Hancke, J., and Vielmetter, W. Mechanisms of overlap formation in nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell Biol*, *14*: 888-895, 1994.
 24. Drouet, J., Delteil, C., Lefrancois, J., Concannon, P., Salles, B., and Calsou, P. DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, *280*: 7060-7069, 2005.
 25. Baumann, P. and West, S. C. DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*: 14066-14070, 1998.
 26. Wang, H., Perrault, A. R., Takeda, Y., Qin, W., and Iliakis, G. Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res*, *31*: 5377-5388, 2003.
 27. Deriano, L., Guipaud, O., Merle-Beral, H., Binet, J. L., Ricoul, M., Potocki-Veronese, G., Favaudon, V., Maciorowski, Z., Muller, C., Salles, B., Sabatier, L., and Delic, J. Human chronic lymphocytic leukemia B cells can escape DNA damage-induced apoptosis through the

- nonhomologous end-joining DNA repair pathway. *Blood*, *105*: 4776-4783, 2005.
28. Lee, J. W., Yannone, S. M., Chen, D. J., and Povirk, L. F. Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in vitro. *Cancer Res*, *63*: 22-24, 2003.
29. Merel, P., Prieur, A., Pfeiffer, P., and Delattre, O. Absence of major defects in non-homologous DNA end joining in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, *21*: 5654-5659, 2002.
30. Yu, L., Goldberg, I. H., and Dedon, P. C. Eneidyne-mediated DNA damage in nuclei is modulated at the level of the nucleosome. *J Biol Chem*, *269*: 4144-4151, 1994.
31. Meresse, P., Dechaux, E., Monneret, C., and Bertounesque, E. Etoposide: discovery and medicinal chemistry. *Curr Med Chem*, *11*: 2443-2466, 2004.
32. Adachi, N., Suzuki, H., Iizumi, S., and Koyama, H. Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *J Biol Chem*, *278*: 35897-35902, 2003.
33. Banath, J. P., Macphail, S. H., and Olive, P. L. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res*, *64*: 7144-7149, 2004.
34. Bryans, M., Valenzano, M. C., and Stamato, T. D. Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: evidence for stabilization by XRCC4. *Mutat Res*, *433*: 53-58, 1999.
35. Biard, D. S., Miccoli, L., Despras, E., Harper, F., Pichard, E., Creminon, C., and Angulo, J. F. Participation of kin17 protein in replication factories and in other DNA transactions mediated by high molecular weight nuclear complexes. *Mol Cancer Res*, *1*: 519-531, 2003.
36. Miccoli, L., Frouin, I., Novac, O., Di Paola, D., Harper, F., Zannis-Hadjopoulos, M., Maga, G., Biard, D. S., and Angulo, J. F. The human stress-activated protein kin17 belongs to the multiprotein DNA replication complex and associates in vivo with mammalian replication origins. *Mol Cell Biol*, *25*: 3814-3830, 2005.
37. Miccoli, L., Biard, D. S., Frouin, I., Harper, F., Maga, G., and Angulo, J. F. Selective interactions of human kin17 and RPA proteins with chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. *Nucleic Acids Res*, *31*: 4162-4175, 2003.
38. Willmore, E., de Caux, S., Sunter, N. J., Tilby, M. J., Jackson, G. H., Austin, C. A., and Durkacz, B. W. A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood*, *103*: 4659-4665, 2004.
39. Reardon, J. T. and Sancar, A. Repair of DNA-polypeptide crosslinks by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*: 4056-4061, 2006.
40. Lee, K. J., Huang, J., Takeda, Y., and Dynan, W. S. DNA ligase IV and XRCC4 form a stable mixed tetramer that functions synergistically with other repair factors in a cell-free end-joining system. *J Biol Chem*, *275*: 34787-34796, 2000.
41. Leber, R., Wise, T. W., Mizuta, R., and Meek, K. The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, *273*: 1794-1801, 1998.
42. Yu, Y., Wang, W., Ding, Q., Ye, R., Chen, D., Merkle, D., Schriemer, D., Meek, K., and Lees-Miller, S. P. DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)*, *2*: 1239-1252, 2003.
43. Matsumoto, Y., Suzuki, N., Namba, N., Umeda, N., Ma, X. J., Morita, A., Tomita, M., Enomoto, A., Serizawa, S., Hirano, K., Sakaia, K., Yasuda, H., and Hosoi, Y. Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS Lett*, *478*: 67-71, 2000.
44. Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugasawa, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem*, *276*: 18665-18672, 2001.
45. Molinier, J., Ramos, C., Fritsch, O., and Hohn, B. CENTRIN2 modulates homologous recombination and nucleotide excision repair in Arabidopsis. *Plant Cell*, *16*: 1633-1643, 2004.
46. Wang, G., Dombkowski, A., Chuang, L., and Xu, X. X. The involvement of XPC protein in the cisplatin DNA damaging treatment-mediated cellular response. *Cell Res*, *14*: 303-314, 2004.
47. Shimizu, Y., Iwai, S., Hanaoka, F., and Sugasawa, K. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. *Embo J*, *22*: 164-173, 2003.
48. Wijnhoven, S. W., Kool, H. J., Mullenders, L. H., van Zeeland, A. A., Friedberg, E. C., van der Horst, G. T., van Steeg, H., and Vrieling, H. Age-dependent spontaneous mutagenesis in Xpc mice defective in nucleotide excision repair. *Oncogene*, *19*: 5034-5037, 2000.

49. Hoogervorst, E. M., van Oostrom, C. T., Beems, R. B., van Benthem, J., van den Berg, J., van Kreijl, C. F., Vos, J. G., de Vries, A., and van Steeg, H. 2-AAF-induced tumor development in nucleotide excision repair-deficient mice is associated with a defect in global genome repair but not with transcription coupled repair. *DNA Repair (Amst)*, 4: 3-9, 2005.
50. Nahari, D., McDaniel, L. D., Task, L. B., Daniel, R. L., Velasco-Miguel, S., and Friedberg, E. C. Mutations in the Trp53 gene of UV-irradiated Xpc mutant mice suggest a novel Xpc-dependent DNA repair process. *DNA Repair (Amst)*, 3: 379-386, 2004.

TABLES

Table 1: NHEJ activity in HeLa knock-down cell extracts. Values are expressed as a percentage of input substrate or as a percentage of control cell values (in brackets). NHEJ efficiency is assessed as the conversion of monomeric linear substrate (L) into multimers (M) and circular products (OC+CC). For experiments with NHEJ-deficient cells, values result from quantification of the blot presented in Figure 2A. For XPC^{KD} cl.21 and XPA^{KD} cl.6 or XPC^{KD} cl.4 (238 days) and cl.24 (188 days) cell extracts, values are the mean \pm standard deviation of 5 and 3 NHEJ reactions, respectively. Statistically significant differences are indicated by an asterisk (*: $p < 0.05$). Extracts from control cells were prepared for each set of experiment as an internal control of extraction quality. Coh.: cohesive DNA ends; bl.: blunt DNA ends; cl.: clone.

DNA ends	Extracts	Efficiency	Multimers	Circular products
3' coh.	Control	49.8	37.9	11.9
	XRCC4 ^{KD}	10.1 (20%)	10.1 (27%)	0
	DNA-PKcs ^{KD}	10.7 (22%)	7.6 (20%)	3.1 (26%)
bl.	Control	40.3	31.5	8.8
	XRCC4 ^{KD}	10.1 (25%)	10.1 (32%)	0
	DNA-PKcs ^{KD}	12.7 (31%)	9.8 (31%)	2.9 (33%)
3'/3'	Control	54.1	40.4	13.7
	XRCC4 ^{KD}	14.6 (27%)	14.6 (36%)	0
	DNA-PKcs ^{KD}	15.9 (29%)	11.6 (29%)	4.3 (31%)
5'/bl.	Control	47.9	35.3	12.6
	XRCC4 ^{KD}	11.1 (23%)	11.1 (31%)	0
	DNA-PKcs ^{KD}	14.1 (29%)	11.3 (32%)	2.8 (22%)
bl./3'	Control	38.5	27.8	10.7
	XRCC4 ^{KD}	10.1 (26%)	10.1 (36%)	0
	DNA-PKcs ^{KD}	9.2 (24%)	6.1 (23%)	3.1 (29%)
5'/3'	Control	33.3	25.8	7.5
	XRCC4 ^{KD}	6.2 (19%)	6.2 (24%)	0
	DNA-PKcs ^{KD}	4.4 (13%)	3.6 (14%)	0.8 (10%)
3' coh.	Control	47.7 \pm 5.3	28.7 \pm 4.1	19 \pm 2.2
	XPA ^{KD} cl.6	46.2 \pm 2 (97%)	25.3 \pm 5.8 (88%)	20.9 \pm 4 (110%)
	XPC ^{KD} cl.21	47.8 \pm 8 (100%)	38.8 \pm 7.3 (135%)	9 \pm 1.1 (47%)*
3'/3'	Control	60.1 \pm 7.5	32.4 \pm 6.1	27.7 \pm 3.9
	XPA ^{KD} cl.6	57.7 \pm 9.4 (96%)	28.4 \pm 7.6 (88%)	29.3 \pm 2.7 (106%)
	XPC ^{KD} cl.21	48 \pm 7.8 (80%)	34.5 \pm 10.4 (106%)	13.5 \pm 6.1 (49%)*
5'/bl.	Control	42.4 \pm 8	27.2 \pm 5.8	15.2 \pm 2.6
	XPA ^{KD} cl.6	45.3 \pm 8.8 (107%)	27.8 \pm 9.3 (102%)	17.5 \pm 4 (115%)
	XPC ^{KD} cl.21	40.8 \pm 5.3 (96%)	32.9 \pm 3.6 (121%)	7.9 \pm 3 (52%)*

bl./3'	Control	40.9 ± 7.3	26.2 ± 6.7	14.7 ± 2.5
	XPA ^{KD} cl.6	42 ± 6.9 (103%)	26.5 ± 6.7 (101%)	15.5 ± 3.5 (105%)
	XPC ^{KD} cl.21	41.6 ± 3.3 (102%)	33.1 ± 1.7 (126%)	8.5 ± 2 (58%)*
5'/3'	Control	35 ± 6.4	25.9 ± 5.4	9.1 ± 1.8
	XPA ^{KD} cl.6	35.8 ± 8.2 (102%)	25.2 ± 6.1 (97%)	10.6 ± 3.9 (116%)
	XPC ^{KD} cl.21	33.7 ± 6.8 (96%)	28 ± 7.4 (108%)	5.7 ± 2.4 (63%)*
3' coh.	Control	53.7 ± 3.5	30.1 ± 8	23.6 ± 4.5
	XPC ^{KD} cl.4	40 ± 8.6 (75%)	23.8 ± 6.7 (79%)	16.2 ± 4.4 (69%)
	XPC ^{KD} cl.24	36 ± 5 (67%)*	25.9 ± 4.1 (86%)	10.1 ± 1.9 (43%)*
3'/3'	Control	62.9 ± 10.7	31.6 ± 10.1	31.3 ± 2
	XPC ^{KD} cl.4	42.8 ± 6.7 (68%)	23.2 ± 5.4 (73%)	19.6 ± 3.9 (63%)*
	XPC ^{KD} cl.24	36.8 ± 4.2 (59%)*	22.3 ± 3.2 (71%)	14.5 ± 1.1 (46%)*
bl./3'	Control	44.3 ± 3.2	32.8 ± 2.3	11.5 ± 0.9
	XPC ^{KD} cl.4	36.6 ± 3.2 (83%)*	28.2 ± 1.8 (86%)	8.4 ± 1.4 (73%)*
	XPC ^{KD} cl.24	28.4 ± 3.3 (64%)*	22.1 ± 2.7 (67%)	6.3 ± 0.6 (55%)*
5'/3'	Control	45.3 ± 6.5	34.6 ± 3.4	10.7 ± 3.2
	XPC ^{KD} cl.4	30.9 ± 3.6 (68%)*	25.2 ± 3.7 (73%)	5.7 ± 1.3 (53%)
	XPC ^{KD} cl.24	24.4 ± 6.2 (54%)*	20.5 ± 6.1 (59%)	3.9 ± 1.6 (36%)*

LEGENDS TO FIGURES

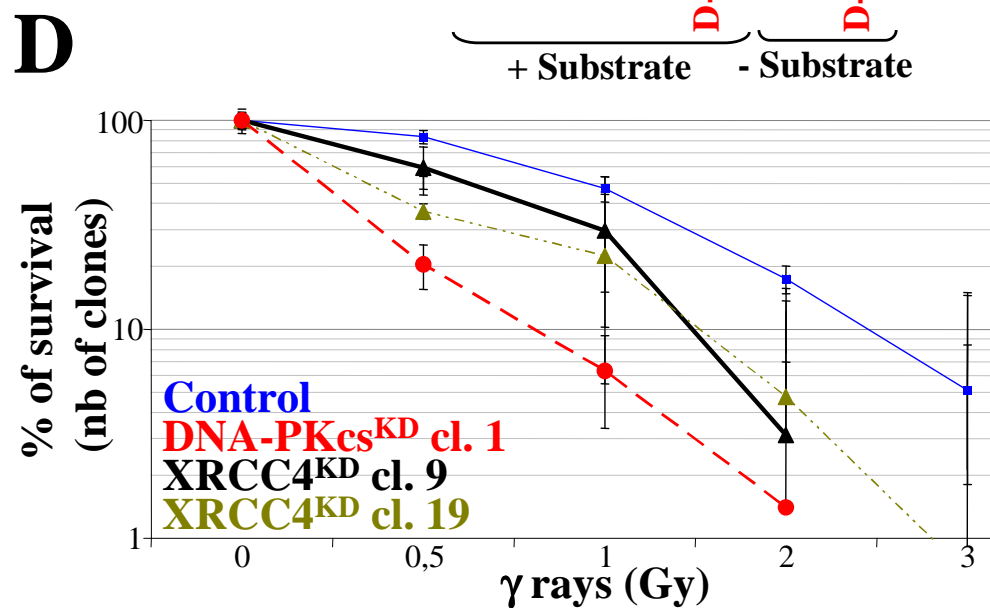
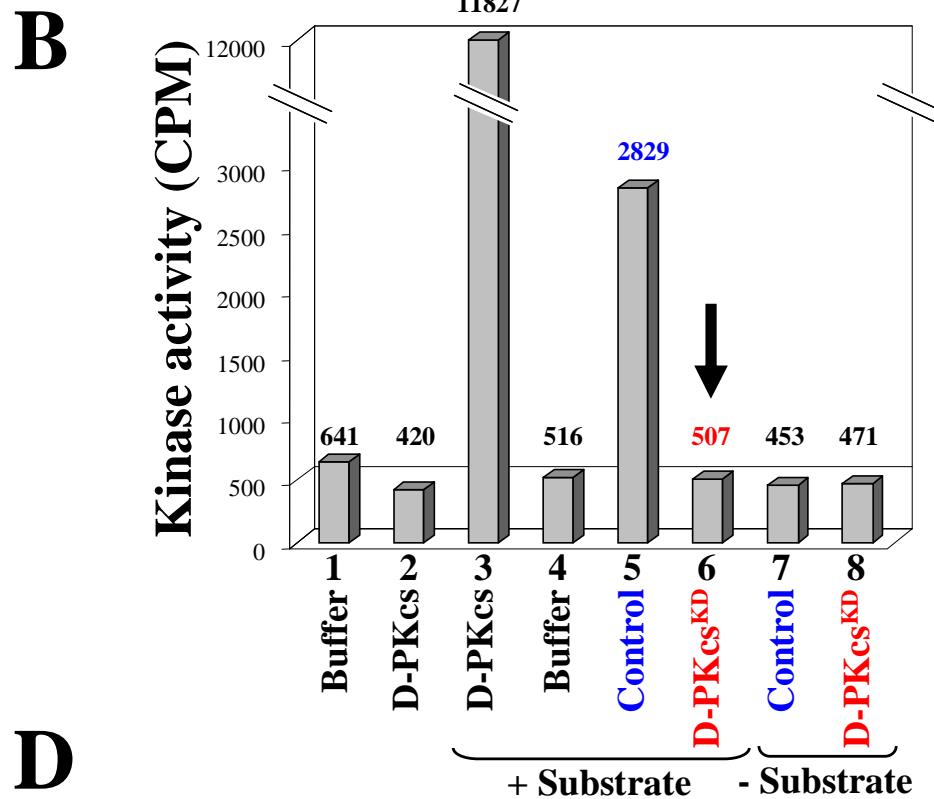
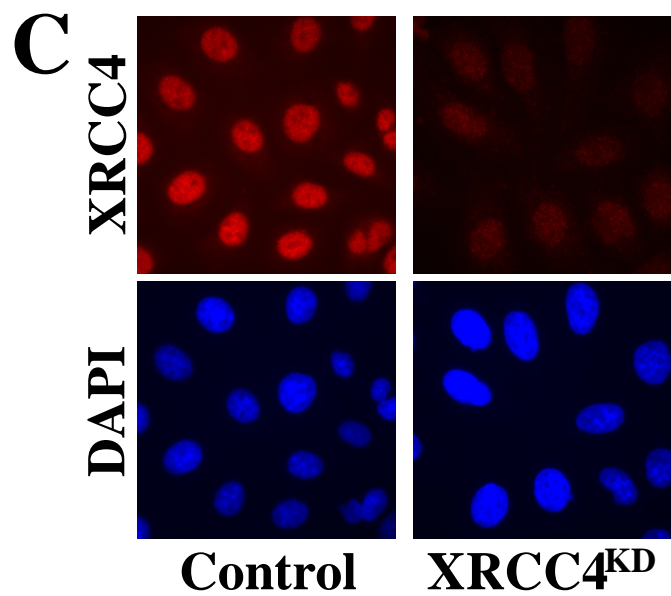
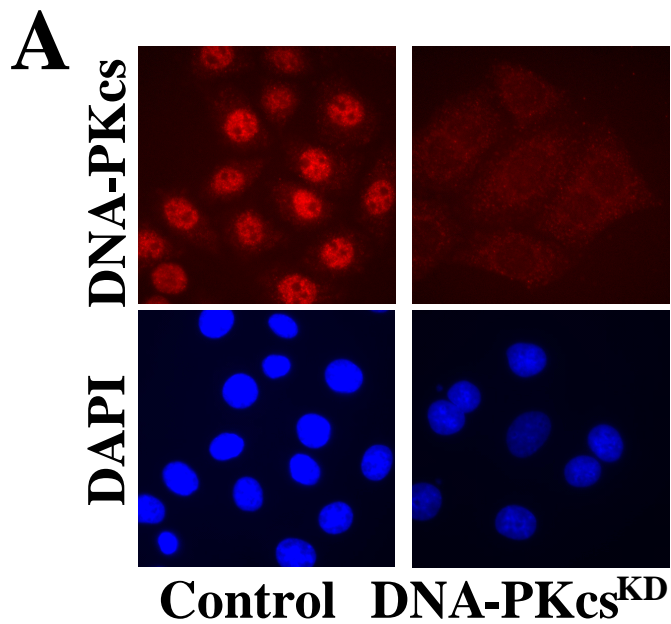
Figure 1: **Characterization of DNA-PKcs^{KD} and XRCC4^{KD} clones.** (A) Immunocytochemical staining of control and DNA-PKcs^{KD} clone (cl.) 1 (day 40) cells with anti-DNA-PKcs antibody. (B) Analysis of DNA-PKcs activity in control and DNA-PKcs^{KD} (D-PKcs^{KD}; day 148) total cell extracts. As a positive control, 50 U of purified DNA-PKcs (D-PKcs) were used. (C) Immunocytochemical staining of control and XRCC4^{KD} cl.9 (day 40) cells with anti-XRCC4 antibody. (D) Clonogenic cell growth of DNA-PKcs^{KD} and XRCC4^{KD} clones (day 58) after exposure to IR. Each point represents the mean of three culture dishes (\pm standard deviation).

Figure 2: **Impairment of the NHEJ pathway in DNA-PKcs^{KD} and XRCC4^{KD} cells.** (A) Agarose gel separation of NHEJ products formed in (1) Control, (2) XRCC4^{KD} cl.9 and (3) DNA-PKcs^{KD} cl.1 (day 75) extracts followed by Southern blotting. Terminus configurations are indicated on top of the blot (bl.: blunt; coh.: cohesive). (B) HeLa extracts (48 μ g of proteins per reaction) were incubated 30 min on ice with increasing doses of wortmannin (0, 0.1, 1 and 5 μ M) diluted in DMSO prior to NHEJ reaction with 3' cohesive DNA end substrate. NHEJ products were separated on 1% agarose gel and submitted to Southern blotting. Reaction products are marked on the right side (M: multimeric products; OC: open circles; L: residual linear substrate; CC: covalently closed circles).

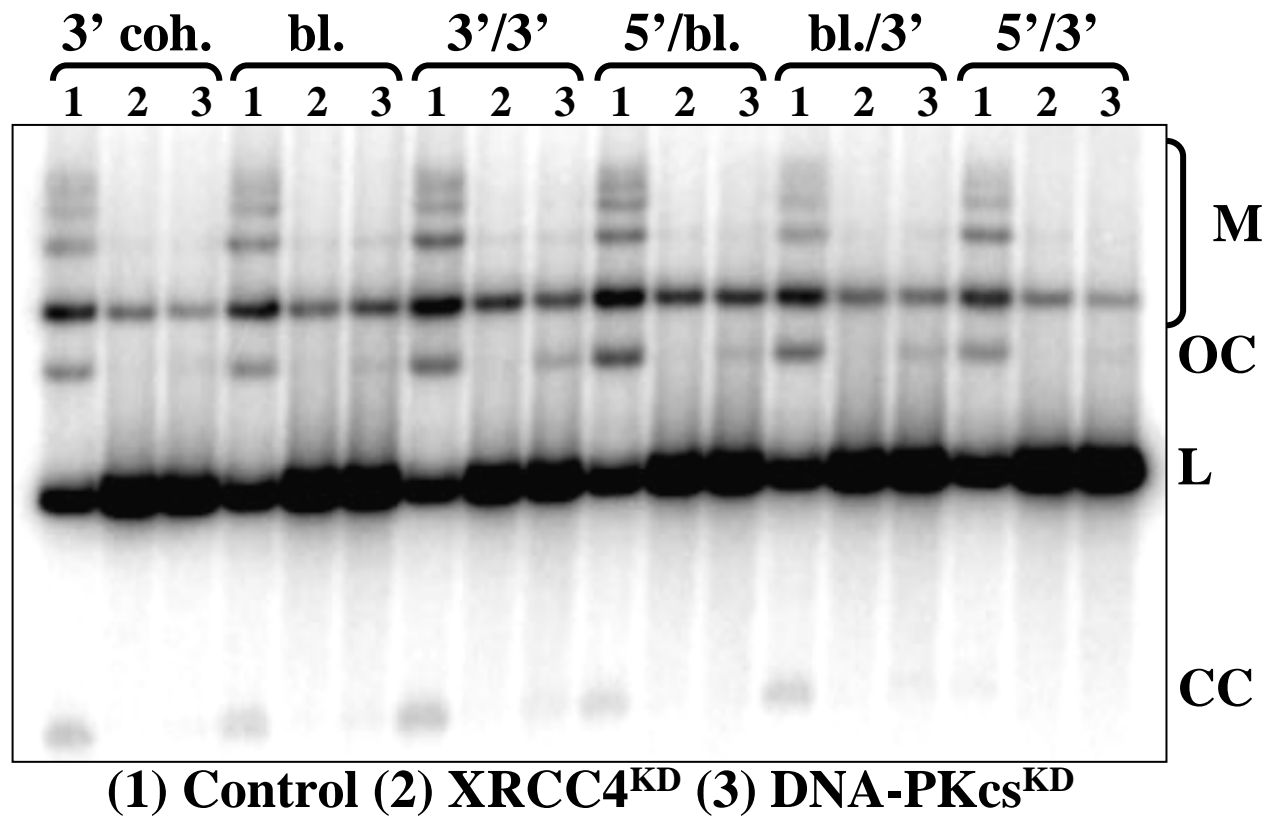
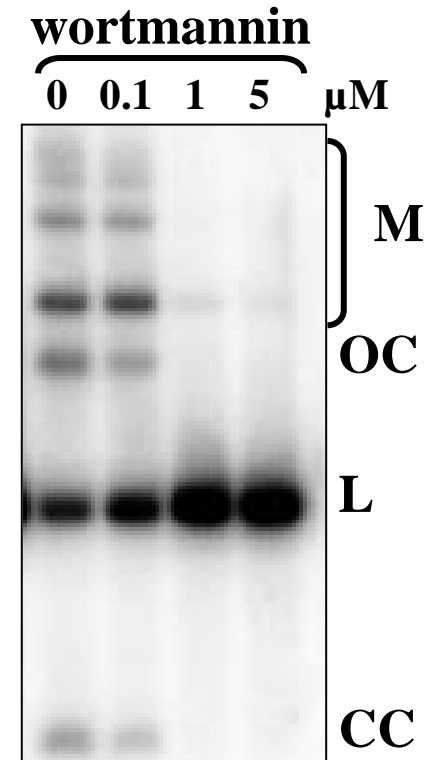
Figure 3: **Sensitivity of NHEJ- and NER-deficient HeLa cells towards DSB induction.** (A) DNA-PKcs^{KD} cl.1 (day 127) cells were treated with NCS for 1 hour. (B) DNA-PKcs^{KD} cl.1 (day 106), XRCC4^{KD} cl.9 (day 106), XPA^{KD} cl.6 (day 255) and XPC^{KD} cl.21 (day 261) and cl.24 (day 218) were treated with etoposide for 6 hours. In A and B, cell survival was assessed in clonogenic cell growth assays. Each point represents the mean of three culture dishes (\pm standard deviation). (C) Effect of acute UVC (10 J/m²) and γ -ray (6 Gy) irradiation after transient *XPA* and *XPC* gene silencing. HeLa cells were transfected with 2 μ g of plasmid. Three days later, cells were trypsinized and cultivated in the presence of hygromycin B for 48 h before irradiation. (D) Effect of acute UVC (10 J/m²) and γ -ray (6 Gy) irradiation on stable DNA PKcs^{KD} cl.1 (day 168), XPC^{KD} cl.21 (day 389) and XPA^{KD} cl.6 (day 420). Cells were seeded one day before irradiation. In C and D, cells were collected by trypsinization 24 h after irradiation, and fixed in 75% ethanol at 4°C. Cells were stained with propidium iodide (4 μ g/ml) in the presence of RNase (10 μ g/ml). Stained cells were analyzed on a FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) using CellQuest software. 10,000 cells gated as single cells using FL2A/FL2W scatter were analyzed.

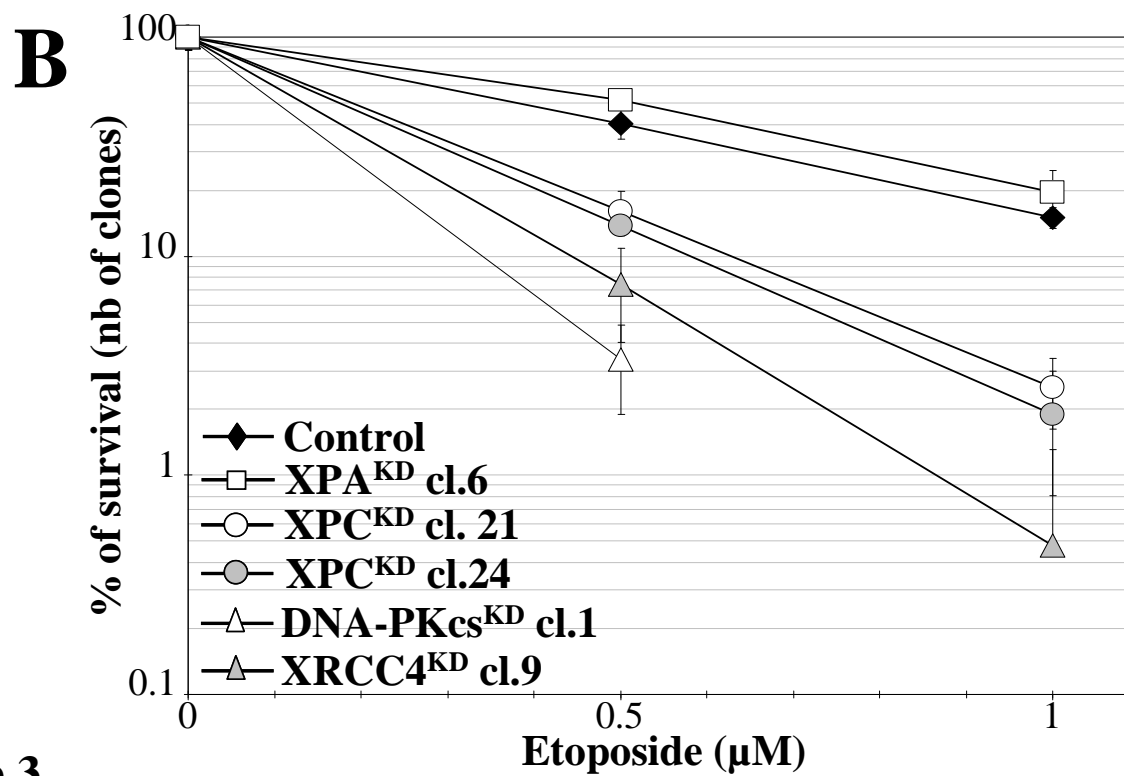
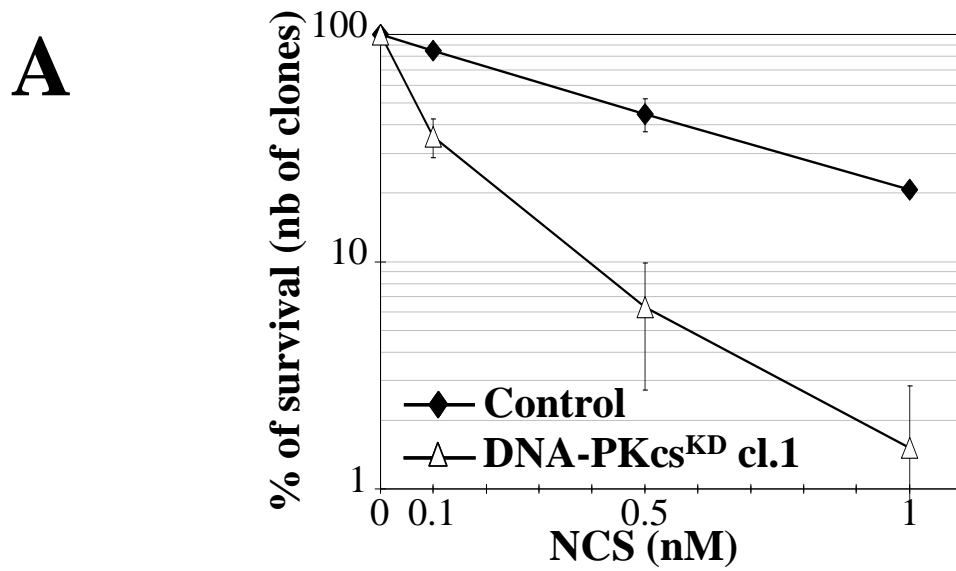
Figure 4: **Alteration of NHEJ activity in HeLa XPC^{KD} cell extracts.** (A) Agarose gel separation of NHEJ products formed in (1) Control, (2) XPA^{KD} cl.6 (day 97) and (3) XPC^{KD} cl.21 (day 200). P1 and P2 correspond to two independent extract preparations. (B) Western blot analysis of total protein content from control cells, XPA^{KD} cl.6 (day 143), XPC^{KD} cl.21 (day 226), KIN17^{KD} cl.5, cl.6 and cl.12 (day 81). PCNA was used as a loading control. (C) NHEJ protein content of HeLa KD clones. Whole cell extracts were prepared as for biochemical fractionation. The protein equivalent of 600,000 cells was separated on polyacrylamide gels and submitted to Western blotting. (1) Control (day 94); (2) DNA-PKcs^{KD} cl.1 (day 94); (3) XRCC4^{KD} cl.9 (day 94); (4) XPC^{KD} cl.4 (day 315); (5) XPC^{KD} cl.21 (day 267); (6) XPC^{KD} cl.24 (day 264); (7) XPA^{KD} cl.6 (day 261). (D) Agarose gel separation of NHEJ products formed in (1) Control, (2) KIN^{KD} cl.6 and (3) KIN^{KD} cl.12. DNA end configurations are indicated on the top of the blots and NHEJ products are marked on the right side (M: multimeric products; OC: open circles; L: residual linear substrate; CC: covalently closed circles).

Figure 5: **Recruitment of NHEJ proteins to nuclear structures after DSB induction.** Cells were treated at the indicated doses of chemicals. Whole cell extracts (WCE) and P2 fraction were prepared as described in Material and Methods. Samples were loaded on 10% SDS PAGE and submitted to Western blotting. (A) Control and DNA-PKcs^{KD} cl.1 (day 88); XPC^{KD} cl.24 (day 260); XPA^{KD} cl.6 (day 257) after 1-hour CAL treatment (700,000 cells per lane). (B) Control, DNA-PKcs^{KD} cl.1 and XRCC4^{KD} cl.9 (day 94); XPC^{KD} cl.21 (day 267) after 1-hour CAL treatment (600,000 cells per lane). (C) Control cells were treated with the indicated doses of NCS for 1 h (400,000 cells per lane). (D) Asynchronous or S-phase synchronised control cells were treated with VP16 for the indicated times (400,000 cells per lane).

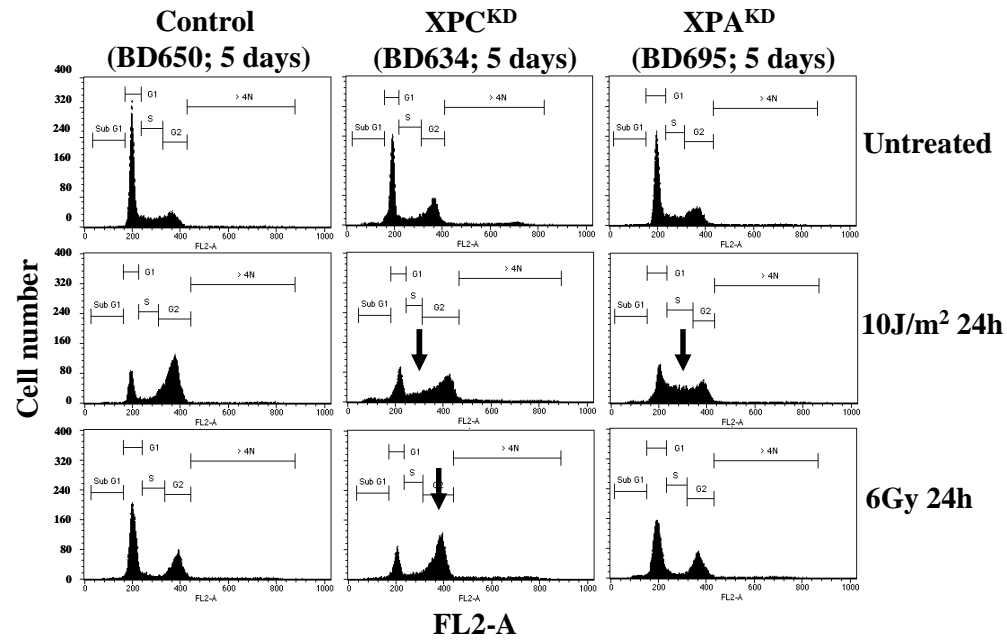
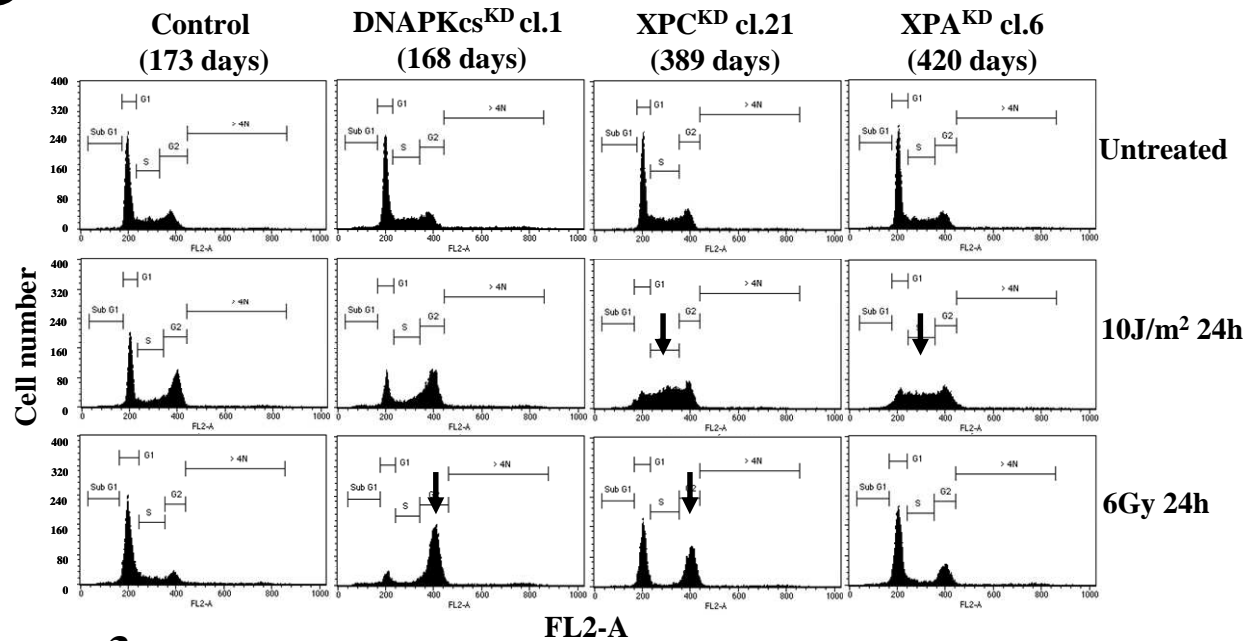


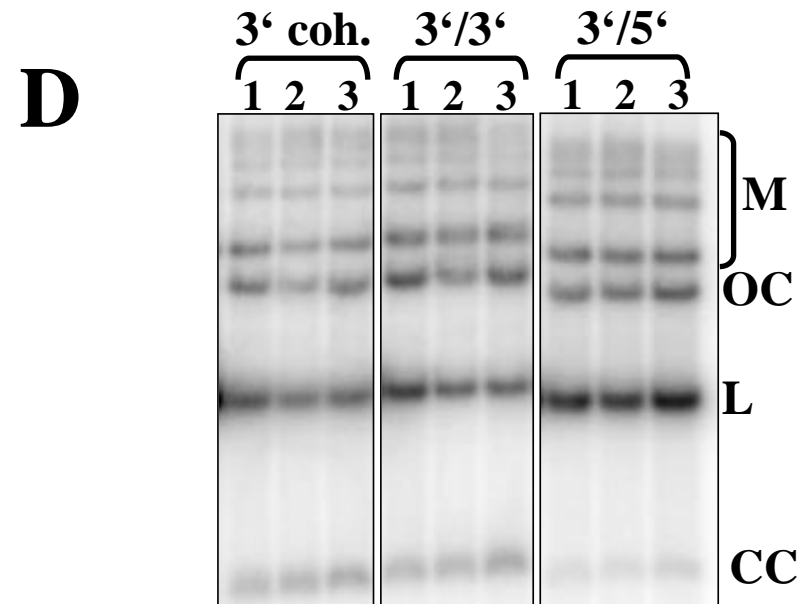
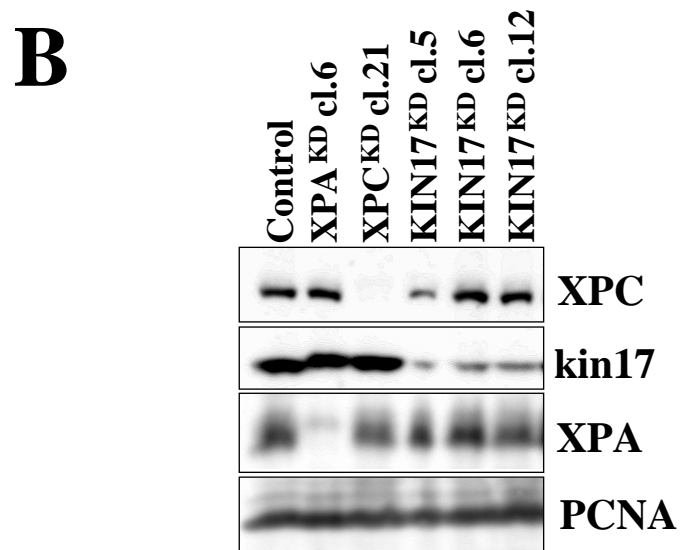
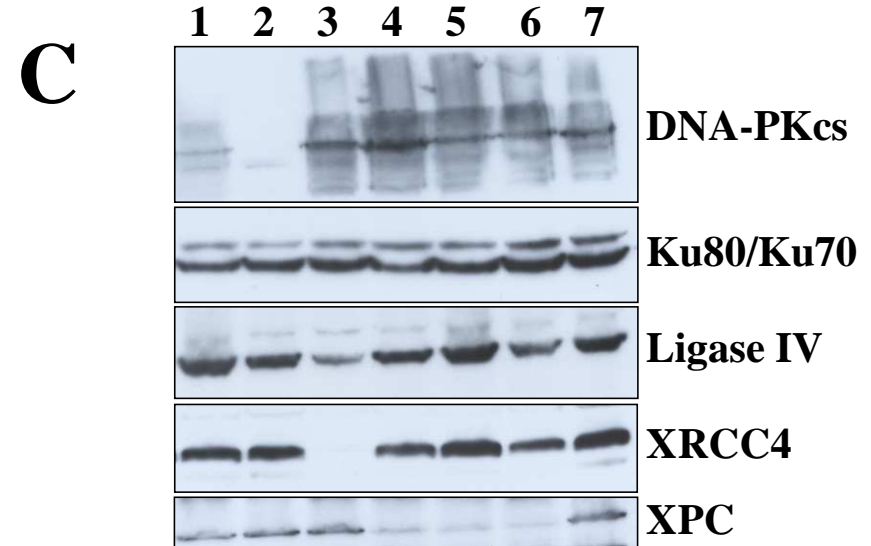
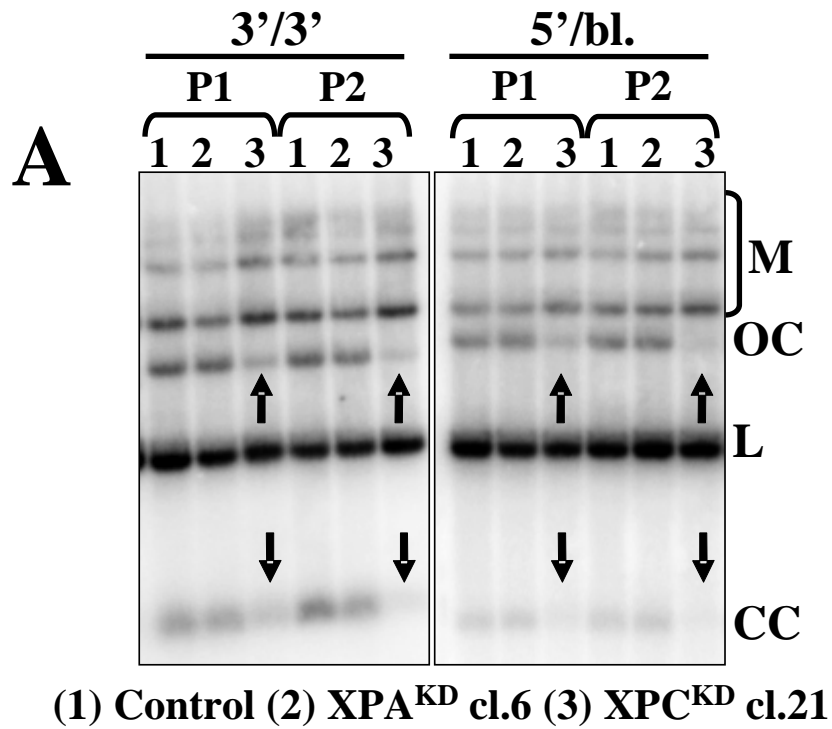
Despras *et al.* figure 1

A**B**

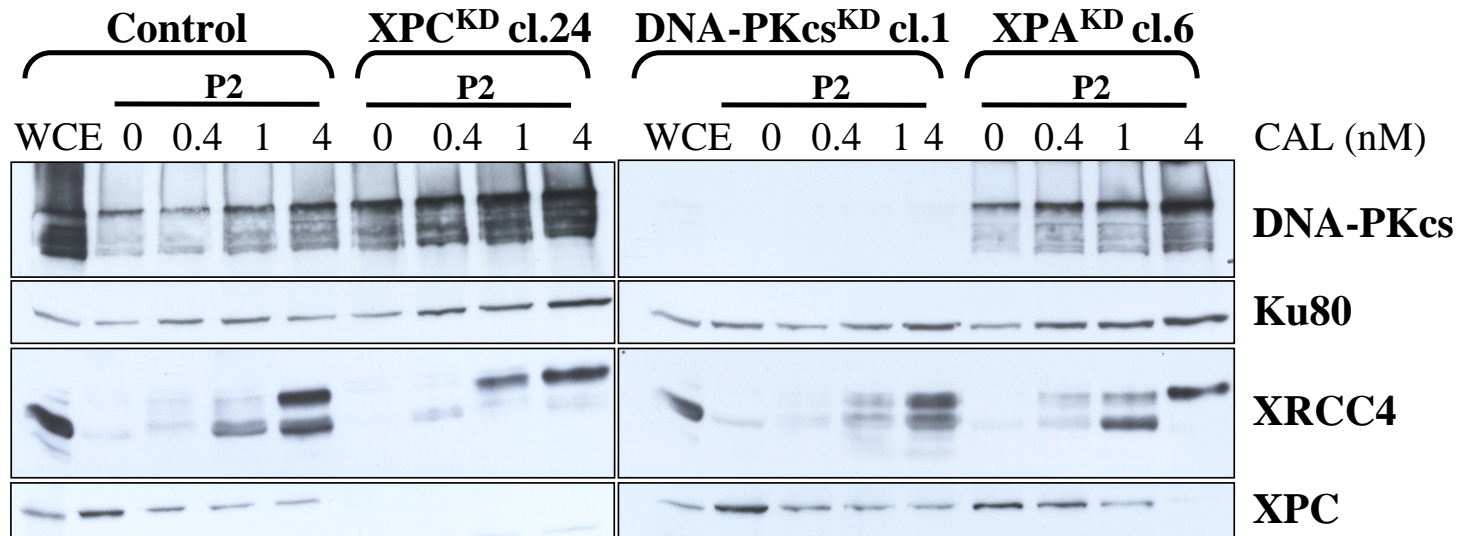
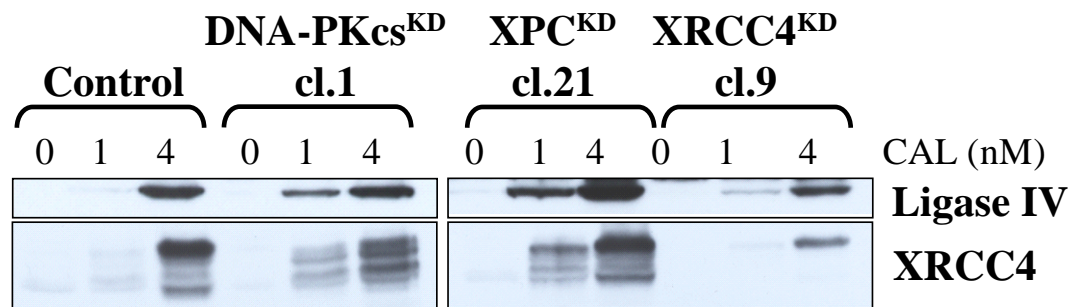


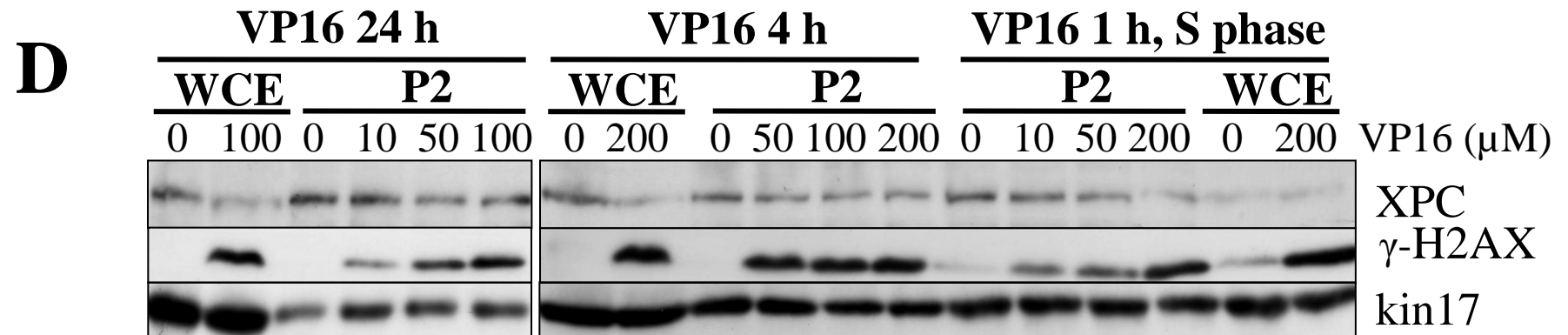
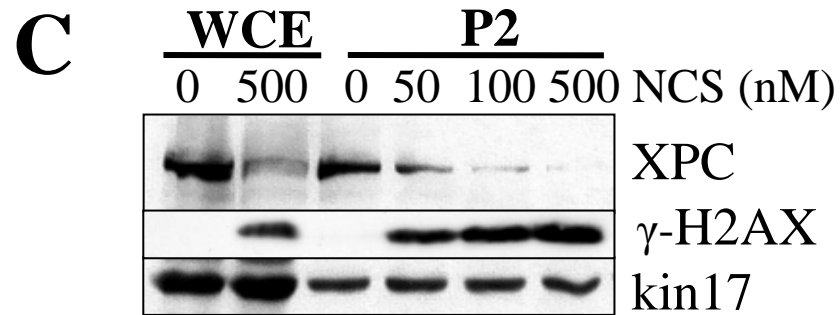
Despras *et al.* figure 3

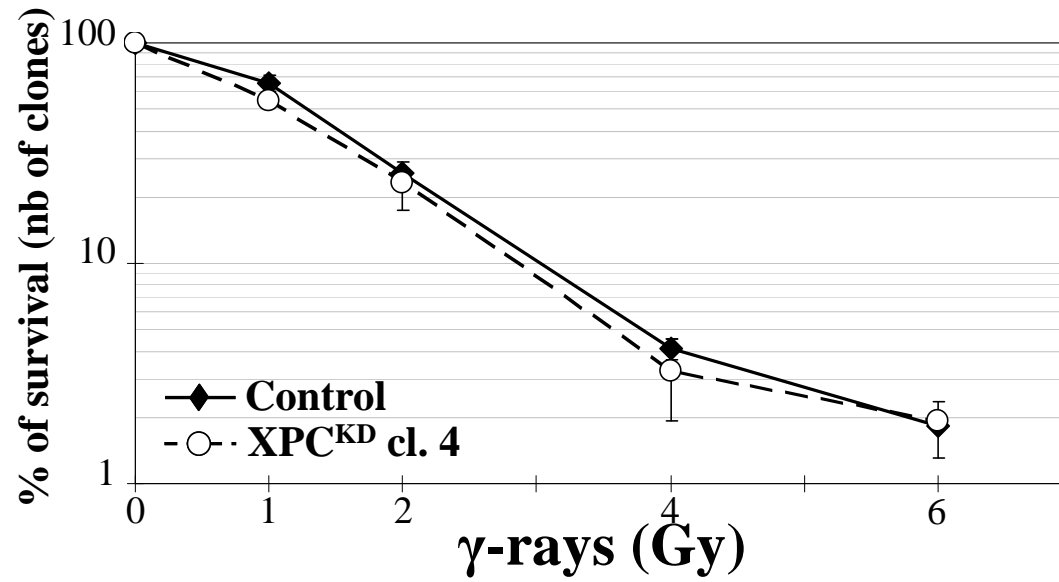
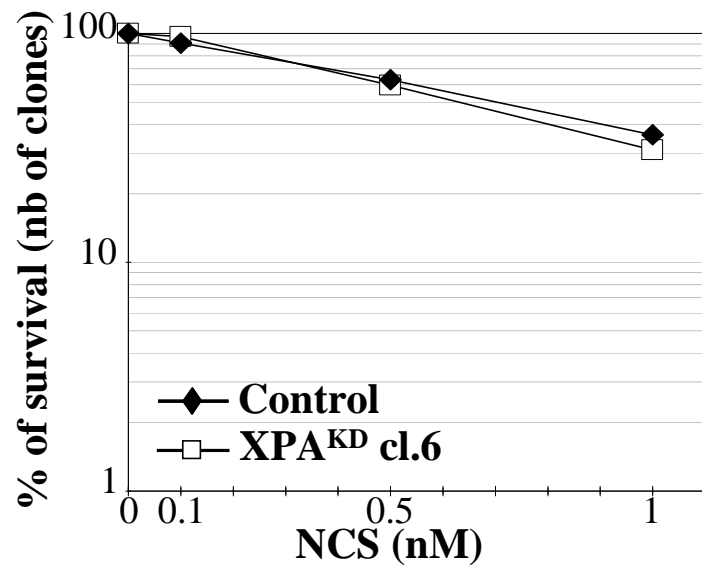
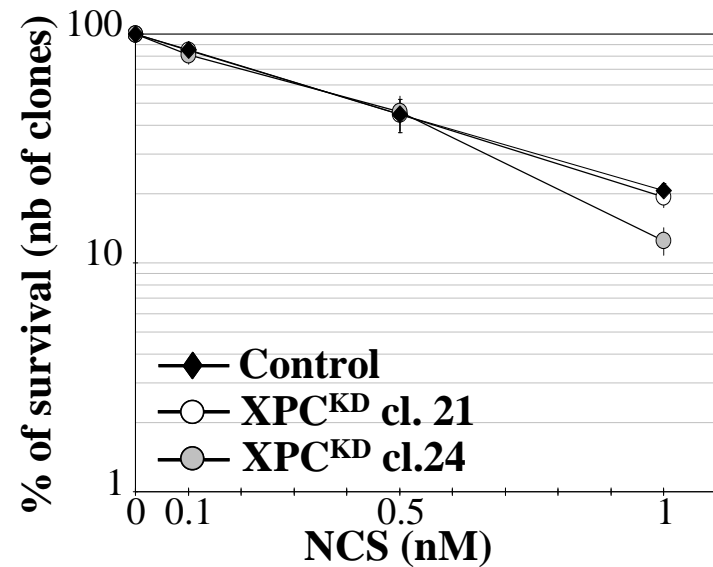
C**D**

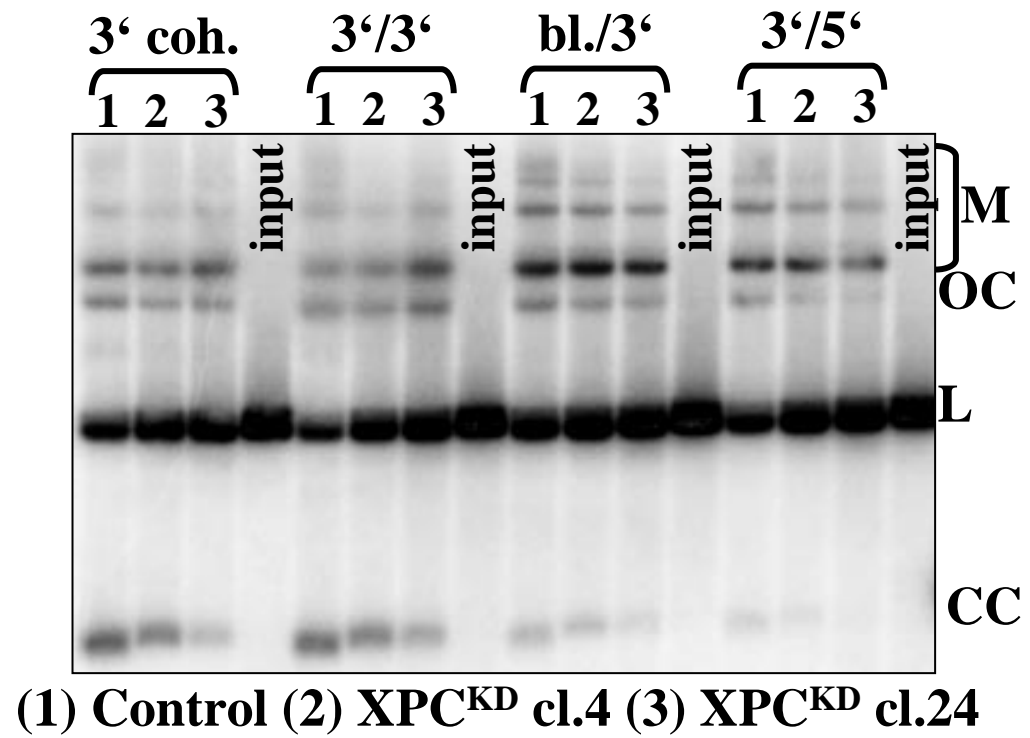


(1) Control (2) KIN17^{KD} cl.6 (3) KIN17^{KD} cl.12

A**B**



A**B****C**



Résultats additionnels

Dans cette section sont présentés des résultats venant enrichir ceux de l'article V.

1. La protéine XRCC4 est hypo-phosphorylée dans les cellules DNA-PKcs^{KD} après induction de DSB.

Nous avons montré que le traitement par la CAL entraînait une phosphorylation et un ancrage dépendant de la dose de la protéine XRCC4 sur les structures nucléaires dans les clones dérivés de la lignée HeLa (Article V). Dans les cellules DNA-PKcs^{KD}, la protéine XRCC4 est non seulement mobilisée à des doses plus faibles de CAL, mais elle est également hypo-phosphorylée par rapport aux cellules « contrôle » (Figure 22A). Nous avons confirmé ce résultat en traitant les cellules à la NCS, une molécule qui appartient à la même famille que la CAL. La CAL et la NCS ont des mécanismes d'action identiques. Cependant, l'action de la NCS est limitée à l'ADN de liaison entre deux nucléosomes, alors que la CAL peut également agir sur l'ADN du cœur du nucléosome (Yu et al., 1994). Dans les clones « contrôle », XPA^{KD} et DNA-PKcs^{KD}, le traitement par la NCS entraîne un recrutement dépendant de la dose de la protéine Ku70 dans la fraction des protéines associées aux structures nucléaires (P2) (Figure 22B). La protéine XRCC4 est également recrutée et phosphorylée de façon dépendant de la dose de NCS. Cependant, dans les cellules DNA-PKcs^{KD}, la bande correspondant à la forme phosphorylée de la protéine XRCC4 migre plus loin, révélant une phosphorylation moins importante de la protéine (Figure 22B).

Ces résultats indiquent que la kinase DNA-PKcs participe à la phosphorylation de la protéine XRCC4 en réponse aux DSB *in vivo*.

Résultats

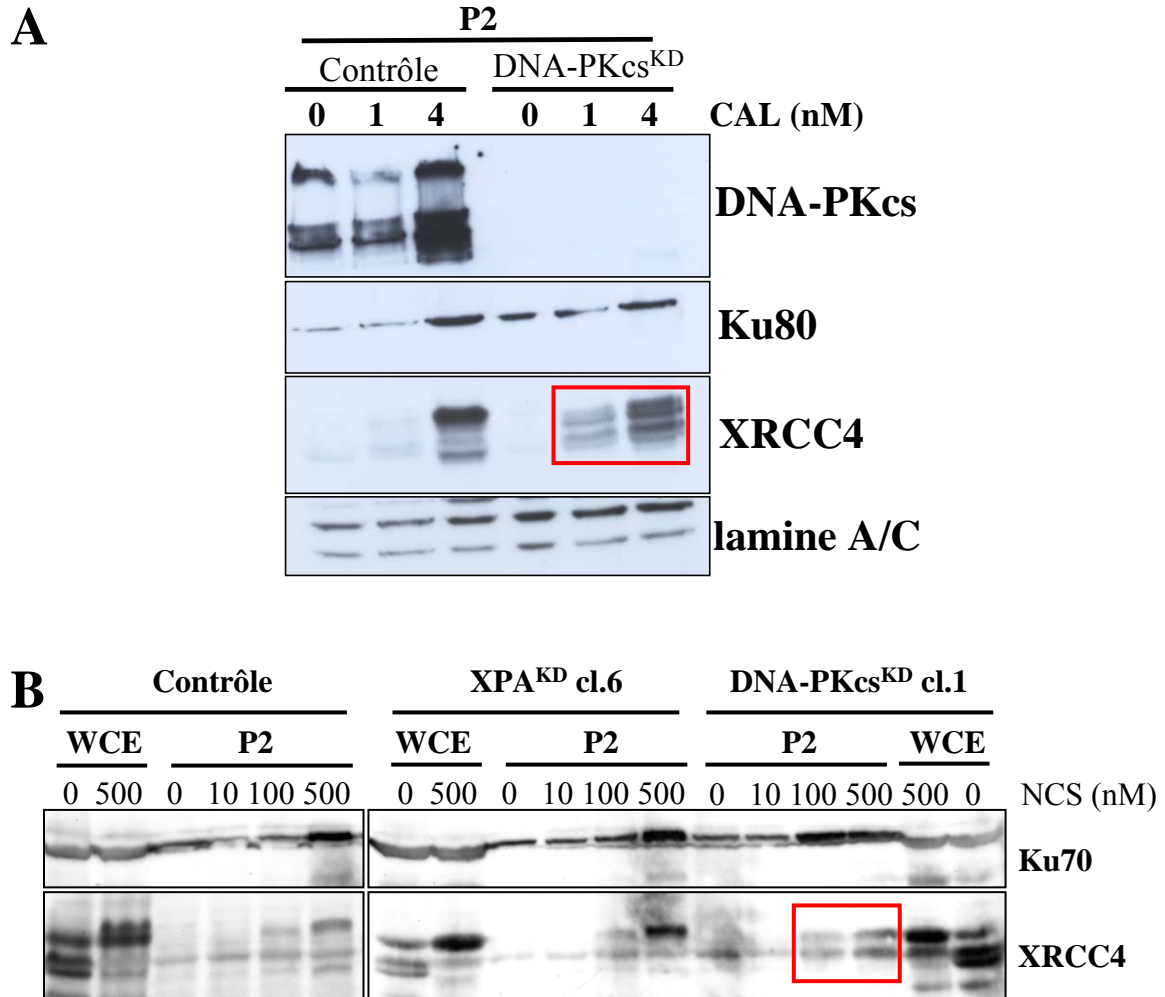


Figure 22: La protéine XRCC4 est hypophosphorylée dans les cellules DNA-PKcs^{KD} après induction de DSB. Les cellules sont traitées par les doses indiquées de (A) calicheamicine (CAL) ou de (B) neocarzinostatine (NCS) pendant 1 h à 37°C avant récupération et extraction dans 0.1% Triton-X100 (15 min sur glace) suivi de 0,2 mg/ml RNase (30 min à 25°C). L'équivalent de 600 000 cellules est séparé sur gel de polyacrylamide et transféré sur membrane PVDF. Les références des anticorps utilisés sont données dans la section Matériel et Méthodes de l'Article V.

2. Implication éventuelle de la protéine XPC dans le NHEJ

A) Expression et activités des protéines clé du NHEJ dans les cellules déficientes en NER

L'altération de la voie NHEJ observée dans les cellules XPC^{KD} pourrait provenir d'une modification des propriétés de certaines protéines clé impliquées dans ce processus. J'ai donc évalué (i) le niveau d'expression des ces protéines, (ii) les capacités d'association du dimère Ku aux extrémités d'ADN double-brin et (iii) l'activité kinase de la DNA-PKcs dans les différents clones issus de la lignée HeLa.

L'analyse par *Western blot* n'a révélé aucune différence significative dans les quantités de protéines Ku70, Ku80, DNA-PKcs, XRCC4 ou LigIV entre les différents clones HeLa KD (Article V).

L'association de Ku aux extrémités d'ADN double-brin a été évaluée par EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) en utilisant une sonde spécifique de Ku (A3/4, Ruiz et al., 1999). Les extraits protéiques sont incubés avec la sonde marquée radioactivement en 5'. Les réactions sont séparées sur gel de polyacrylamide 5% (voir la section Matériel et Méthodes pour un protocole détaillé). La formation de complexes Ku/ADN entraîne une diminution de la mobilité de la sonde (*shift*). L'addition d'anticorps dirigés contre Ku accentue encore cette diminution de mobilité (*super shift*). Les extraits de cellules HeLa, « contrôle », XPA^{KD} et XPC^{KD} présentent des activités d'association de Ku à l'ADN similaires (Figure 23).

Résultats

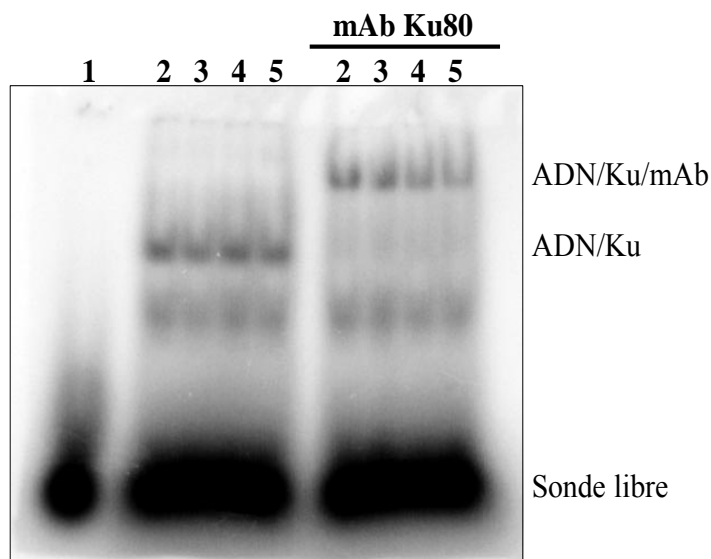


Figure 23: Activité d'association de Ku à l'ADN dans les extraits de cellules XPC^{KD} et XPA^{KD}. 5 µg de protéines et 4 pg de sonde A3/4 radioactive sont incubées 20 min à température ambiante (voir Annexes pour le protocole complet). Dans les réactions de droite, 20 ng d'un anticorps dirigé contre Ku80 (mAb Ku80) sont ajoutés et les réactions sont incubées 10 min supplémentaires. Les réactions sont séparées sur gel de polyacrylamide et le gel est analysé par imagerie phosphore. (1) sonde; (2) HeLa; (3) « contrôle »; (4) XPA^{KD} cl.6 jour 213; (5) XPC^{KD} cl.21 jour 219.

Pour quantifier l'activité kinase de la protéine DNA-PKcs, j'ai utilisé un test *in vitro* (*pull-down assay*). Ce test est basé sur l'affinité de la protéine DNA-PKcs pour les extrémités d'ADN double-brin. Les extraits protéiques sont précipités par de l'ADN double-brin associé à de la cellulose. Cette étape permet d'enrichir les échantillons en protéine DNA-PKcs et d'activer cette dernière. La fraction précipitée est ensuite incubée en présence d'un peptide synthétique portant le motif consensus de phosphorylation de la DNA-PKcs et d'ATP radioactif. L'activité kinase est exprimée en fonction de l'incorporation de radioactivité dans le peptide, évaluée par scintillation liquide (voir la section Matériel et Méthodes pour un protocole détaillé). Ce protocole m'a permis de montrer que les cellules DNA-PKcs^{KD} présentent un niveau d'activité de DNA-PKcs équivalent au bruit de fond de la technique (Article V). Les résultats présentés Figure 24 confirment cette observation. L'activité DNA-PKcs exprimée en pourcentage de celle observée dans la lignée « contrôle » est de 71%, 93%, 121% et 81% pour les cellules parentes HeLa, les cellules XPC^{KD} cl.21, XPC^{KD} cl.24 et

Résultats

XPA^{KD} cl.6 respectivement. Ces variations ne reflètent pas les différences de NHEJ *in vitro* entre les lignées. Soit elles ne sont pas significatives, soit elles reflètent bien des différences dans l'activité kinase de la protéine DNA-PKcs mais celles-ci ne permettent pas d'expliquer les différences d'activité NHEJ observées.

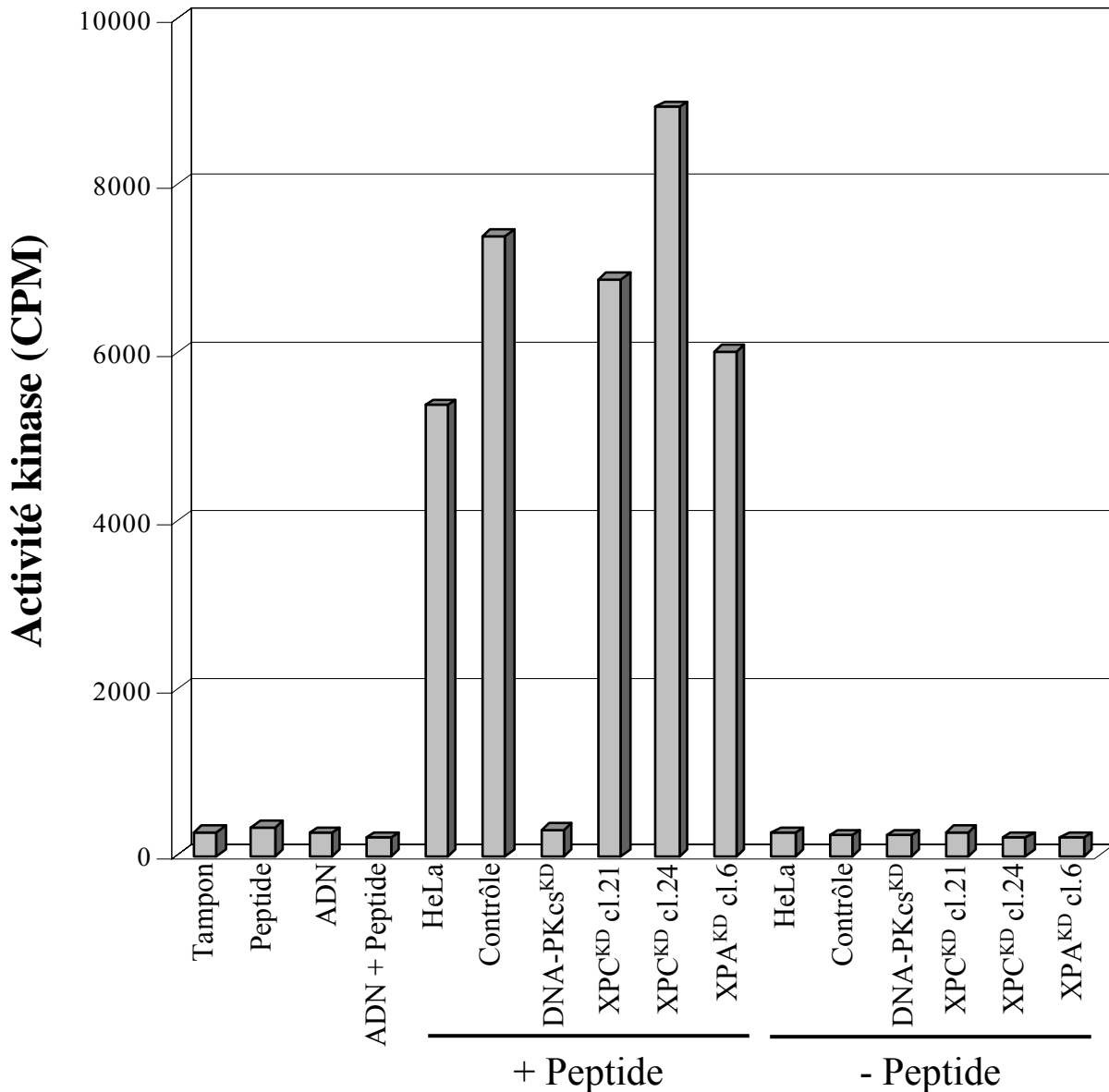


Figure 24: Activité de la kinase DNA-PKcs dans les extraits de cellules XPC^{KD} et XPA^{KD}. 25 µg de protéines sont précipitées par 5 mg d'ADN double brin/cellulose. La fraction précipitée, enrichie en protéine DNA-PKcs, est incubée avec 4 nmol d'un peptide cible de la DNA-PKcs en présence de [γ -³²P]ATP. L'incorporation de radioactivité est mesurée par scintillation liquide. Les réactions sans addition du peptide ou de protéines permettent d'évaluer le bruit de fond de la méthode (voir Annexes pour le protocole complet).

Résultats

En conclusion, les effets de la réduction de l'expression du gène *XPC* sur le NHEJ ne proviennent ni d'une modification de l'expression des protéines majeures du NHEJ, ni d'une modification des activités de Ku et DNA-PKcs.

B) Phosphorylation de l'histone H2AX en réponse aux RI

J'ai analysé la phosphorylation de l'histone H2AX en réponse à différentes doses de rayons γ par marquage immunocytochimique (Figure 25). Afin de ne prendre en compte que la fraction de γ -H2AX étroitement associée à la chromatine, les cellules sont extraites dans une solution contenant 0,5% de Triton-x100 avant fixation. Dans ces conditions, le niveau de γ -H2AX en l'absence d'irradiation est très faible. Seules certaines cellules contiennent des foyers γ -H2AX (comparer le marquage γ -H2AX et le DAPI à 0 Gy Figure 25). Trente minutes après irradiation, les 6 lignées analysées présentent une augmentation de la phosphorylation de H2AX dépendant de la dose d'irradiation (Figure 25A). Toutes les cellules contiennent alors des foyers γ -H2AX. Les diverses déficiences analysées n'ont pas de conséquences sur le niveau de phosphorylation initial de l'histone après induction de DSB. En particulier, H2AX est efficacement phosphorylé 30 min après irradiation dans les cellules DNA-PKcs^{KD}. Ceci est en accord avec le rôle redondant des kinases ATM et DNA-PKcs (Stiff et al., 2004). Vingt-quatre heures après irradiation à 5 Gy, les cellules HeLa, « contrôle », XPC^{KD} et XPA^{KD} retrouvent un niveau de γ -H2AX comparables aux cellules non irradiées (Figure 25B). A des doses plus élevées (10 et 20 Gy), le niveau de γ -H2AX baisse fortement entre 30 min et 24 h mais des foyers persistent, qui pourraient marquer la présence de cassures non réparées. Dans les cellules déficientes en NHEJ, le signal γ -H2AX reste élevé et comparable à celui obtenu 30 min après irradiation 24 h après irradiation à 20 Gy dans les cellules XRCC4^{KD} et pour toutes les doses dans les cellules DNA-PKcs^{KD} (Figure 25B, encadré).

Résultats

La réduction de l'expression des protéines XPC et XPA ne modifie donc pas la cinétique d'apparition et de disparition de γ -H2AX après exposition aux RI. *A contrario*, dans les cellules DNA-PKcs^{KD} et, dans une moindre mesure, dans les cellules XRCC4^{KD}, un nombre important de foyers γ -H2AX persiste 24 h après irradiation. A ces doses élevées de RI, la relation entre disparition de γ -H2AX et réparation n'est pas encore claire (Bouquet et al., 2006). Cependant, la persistance d'un nombre élevé de foyers γ -H2AX est en accord avec le défaut du NHEJ et la radiosensibilité observés dans ces deux clones.

C) Analyse du NHEJ in vitro dans des cellules dérivées d'un patient XP-C

Afin d'étudier le NHEJ *in vitro* dans des cellules de patients XP-C, j'ai utilisé des extraits de la lignée XP44RO (métastase testiculaire de mélanome). La lignée complétée par infection avec un virus portant l'ADNc du gène XPC (XP44RO^{XPC}) sert de contrôle positif.

Les extraits des deux lignées assurent la formation de jonctions intra- et inter-moléculaires (Figure 26A). La quantification des produits de réparation ne met pas en évidence de différences significatives en présence ou en l'absence de la protéine XPC (Figure 26B). L'efficacité globale du NHEJ *in vitro* est comparable dans les cellules XP44RO, XP44RO^{XPC} et HeLa « contrôle » (Tableau 7). On peut toutefois noter que si la capacité de re-circularisation des substrats présentant des extrémités 3' cohésives ou non complémentaires est similaire dans les trois extraits, les cellules XP44RO et XP44RO^{XPC} présentent une baisse de la formation de produits circulaires à partir des substrats plus complexes mettant en présence des extrémités 5'/franche, 3'/franche et 5'/3'. Cette diminution, qui varie entre 40 et 60% des valeurs mesurées dans les extraits de cellules HeLa « contrôle », est du même ordre que celle observée dans les cellules HeLa XPC^{KD} cl.21 (Article V).

Résultats

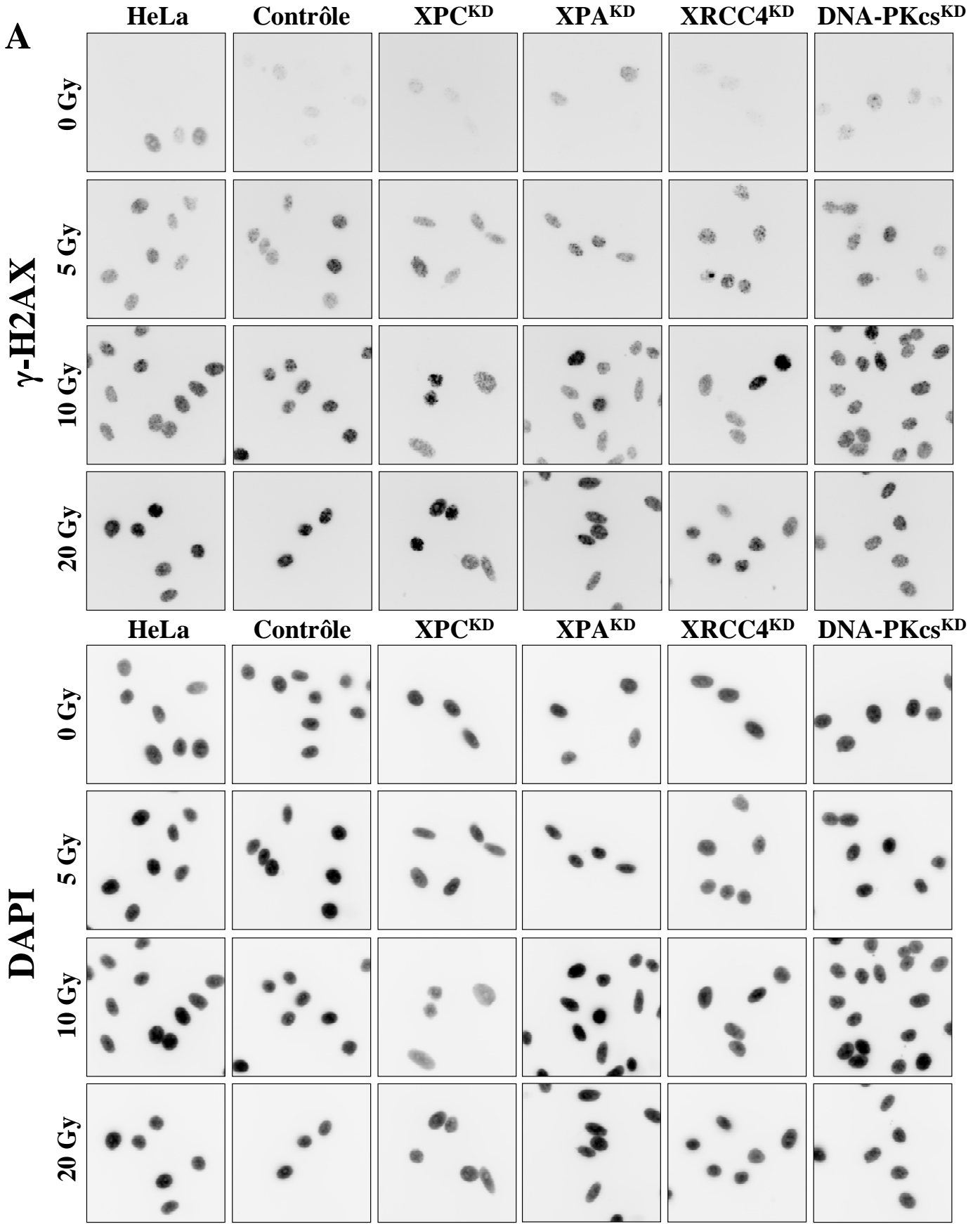
Les cellules HeLa et HEK 293 présentent des efficacités de NHEJ similaires mais des profils de réparation différents selon les substrats (Figure 16B). Il est difficile de déterminer si les différences observées entre les lignées XP44RO et la lignée HeLa « contrôle » sont dues à la différence de type cellulaire ou reflètent un effet du phénotype XP-C. Si cette deuxième hypothèse est vraie, la complémentation par l'ADNc du gène *XPC* ne permet pas de retrouver une re-circularisation comparable aux extraits de cellules HeLa « contrôle ».

Extrémités	Lignées	Efficacité	Cercles
3' cohésives	HeLa Contrôle	50 ± 5,4	21 ± 3,9
	XP44RO ^{XPC}	59	21 (100%)
	XP44RO	57	19 (90%)
3'/3'	HeLa Contrôle	61 ± 8,2	29 ± 2,8
	XP44RO ^{XPC}	58	24 (83%)
	XP44RO	53	27 (93%)
5'/franche	HeLa Contrôle	47 ± 10	14 ± 3
	XP44RO ^{XPC}	51	9 (64%)
	XP44RO	45	6 (43%)
franche/3'	HeLa Contrôle	42 ± 6,1	13 ± 2,5
	XP44RO ^{XPC}	42	8 (62%)
	XP44RO	39	7 (54%)
5'/3'	HeLa Contrôle	39 ± 8	10 ± 0,6
	XP44RO ^{XPC}	38	4 (40%)
	XP44RO	34	6 (60%)

Tableau 7 : Comparaison du NHEJ *in vitro* dans des cellules HeLa et des cellules de patient XP-C. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du substrat initial. Pour les extraits de cellules HeLa « contrôle », elles correspondent à la moyenne (± écart type) de 7 ou 8 réactions effectuées avec trois préparations d'extraits indépendantes. Pour les extraits de cellules XP44RO et XP44RO^{XPC}, elles sont issues de la quantification du gel présenté Figure 26A.

Les cellules XP44RO présentent l'avantage d'avoir été complémentées. Cependant, elles dérivent d'un mélanome et représentent donc un cas très particulier de cellules de patient. De plus, les cellules XP44RO complémentées présente un niveau de protéine XPC élevé. Or ceci pourrait influencer la réparation puisque des expériences de micro-injections de protéine XPC dans des cellules déficientes ont mis en évidence la toxicité de niveaux importants de protéine XPC (Ng et al., 2003). C'est pour s'affranchir de ce genre de problèmes que nous avons développé notre système d'ARNi à long terme.

Résultats



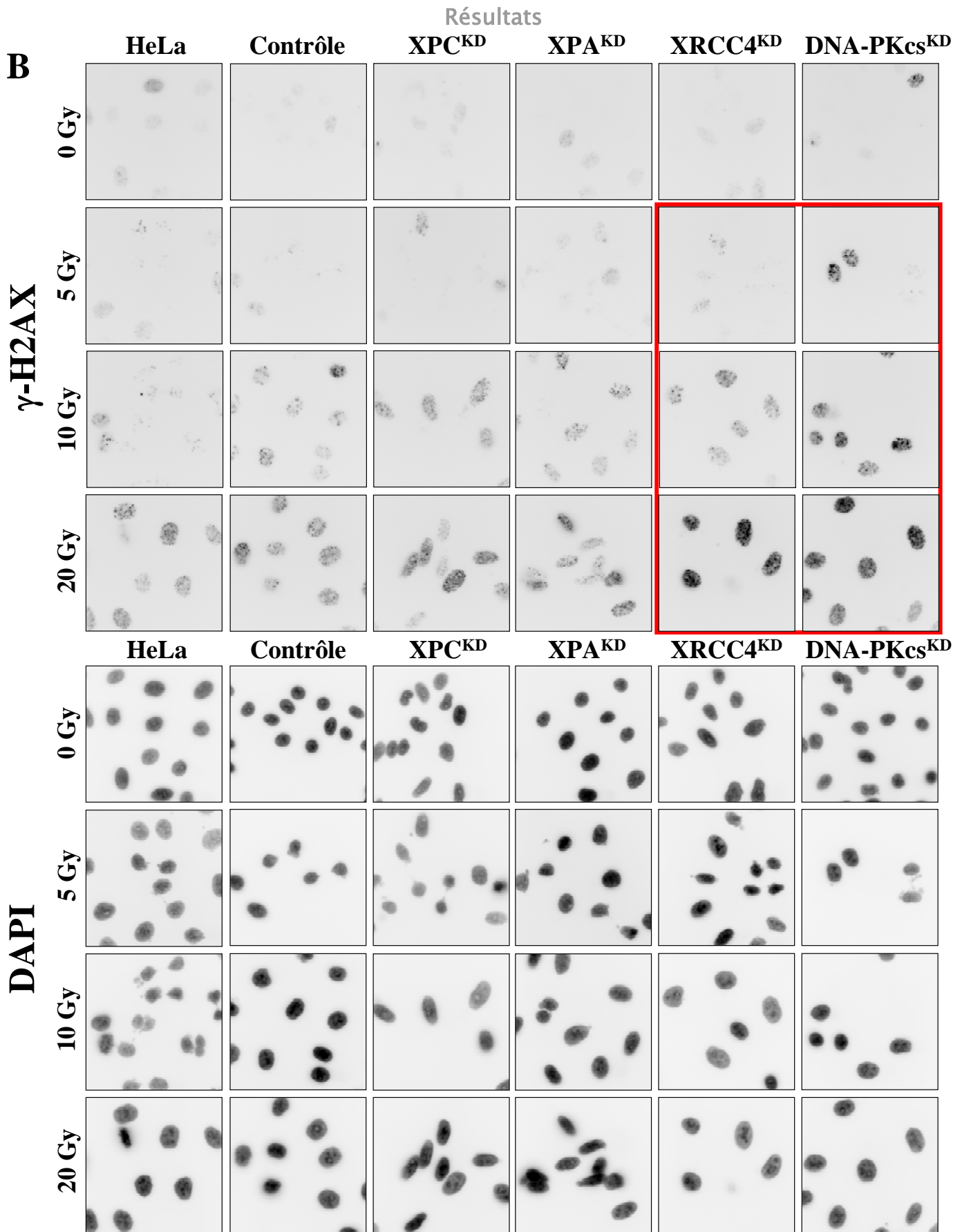


Figure 25: Phosphorylation de l'histone H2AX après irradiation dans les clones HeLa. Les cellules cultivées sur lamelles de verre sont irradiées aux doses indiquées à gauche. (A) 30 min et (B) 24 h après, les lamelles sont placées 10 min dans une solution de Triton x100 0,5% puis fixées dans du paraformaldéhyde 4%. La phosphorylation de l'histone H2AX est détectée par marquage immunocytochimique avec un anticorps spécifique de γ -H2AX (Upstate). Grossissement: x350

Résultats

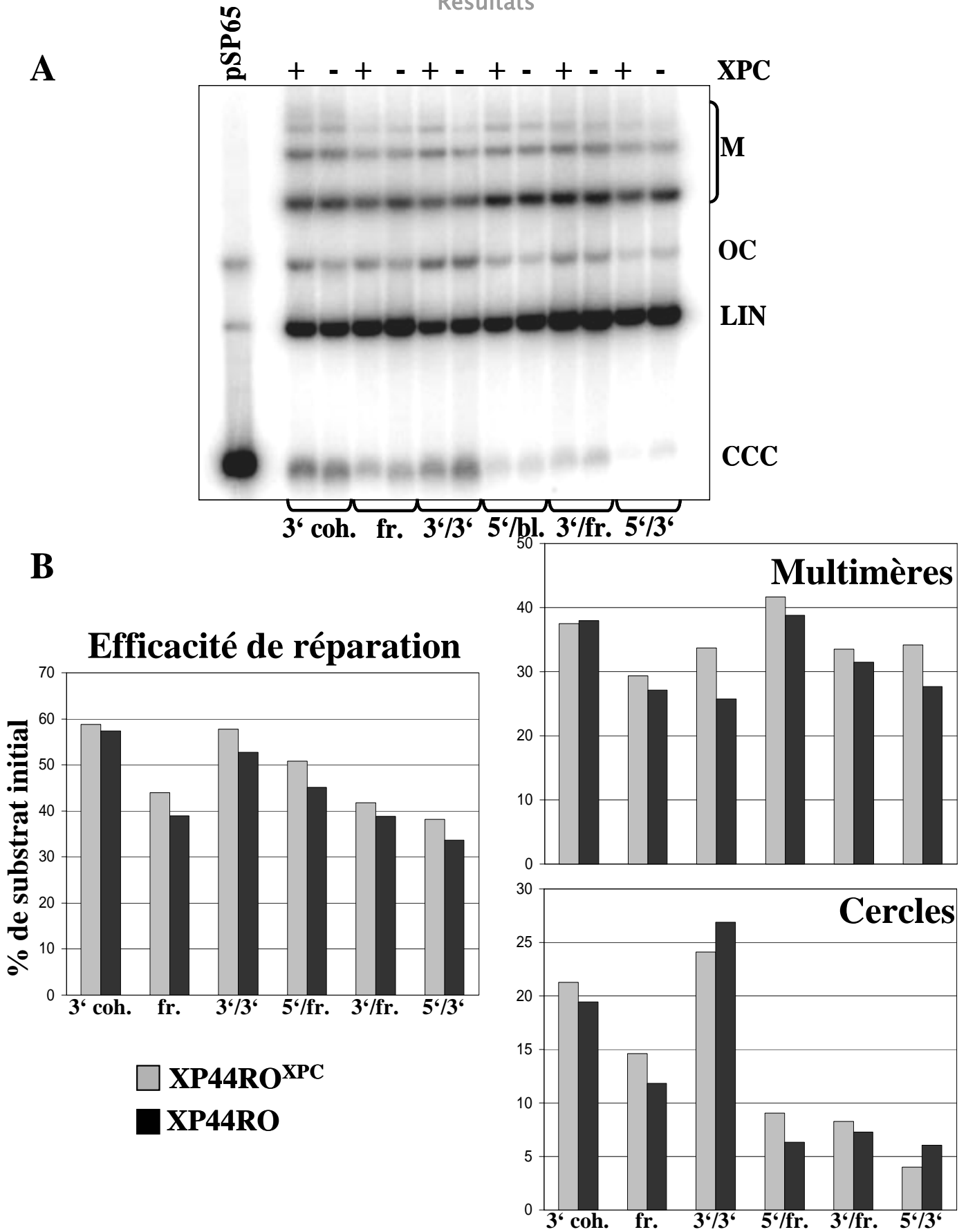


Figure 26: Activité NHEJ des extraits de cellules XP44RO. (A) Analyse par *southern blotting* du profil de réparation NHEJ dans des extraits de cellules XP44RO (déficientes en XPC) et XP44RO complémentées par introduction virale de l'ADNc du gène *XPC* (XP44RO^{XPC}). (B) Quantification des produits de réparation NHEJ par le logiciel ImageQuant.

Conclusions

et

Perspectives

La protéine kin17, la réplication et la réponse aux dommages de l'ADN

Au cours de mon travail de thèse, les résultats obtenus au laboratoire ont permis de préciser l'implication de la protéine *HSAkin17* dans deux grands mécanismes du métabolisme de l'ADN : la réplication et la réparation.

1. La protéine kin17 et la réplication de l'ADN

A) Niveau d'expression de la protéine kin17 et prolifération

Le gène *KIN17* est essentiel chez la levure *S. pombe* (Angulo, communication personnelle). Chez l'homme, l'ARNm du gène *HSAKIN17* est trouvé dans tous les tissus et les lignées tumorales analysés (Kannouche et al., 2000). Nous avons donc déterminé le niveau de protéine *HSAkin17* dans différentes lignées humaines en culture. La protéine *HSAkin17* est exprimée dans les 16 lignées tumorales analysées avec des niveaux variés (Article II). Les différences de quantité de protéine *HSAkin17* observées dans les lignées K562, HeLa, HL-60 et A549 sont en accord avec les variations d'ARNm rapportées précédemment (Kannouche et al., 2000).

Différents résultats suggèrent un lien entre le niveau de protéine kin17 et la capacité de prolifération cellulaire :

(i) Le niveau d'expression du gène *KIN17* est plus faible dans les cellules quiescentes, confluentes ou différenciées par rapport à des cellules en prolifération (Biard et al., 1997b; Kannouche et al., 1998; Pinon-Lataillade et al., 2004).

Conclusions et Perspectives

(ii) Des fibroblastes immortalisés par le virus SV-40 présentent en outre un niveau de protéine $HSAkin17$ plus élevé que des fibroblastes normaux (Miccoli et al., 2002).

(iii) La sur-expression de la protéine $HSAkin17$ dans trois lignées tumorales (RKO, H1299 et HCT 116) et une lignée immortalisée (HEK 293) entraîne une réduction importante de la prolifération (entre 6,5 et 1,4% du contrôle) (Article II). Cet effet est indépendant du phénotype *p53*.

(iv) L'extinction du gène $HSAKIN17$ par ARNi dans des cellules HeLa réduit considérablement leur croissance dans les deux mois qui suivent la transfection (Article IV). Passé ce délai, les cellules $KIN17^{KD}$ sont susceptibles de dépasser cette contrainte biologique et retrouvent une croissance normale. La croissance cellulaire est également affectée dans les cellules RKO exprimant un transcrit *antisens* de l'ADNc de $HSAKIN17$ (Article I).

En conséquence, l'expression du gène $KIN17$ doit être strictement régulée pour assurer la prolifération cellulaire. Les différences observées entre lignées pourraient être une conséquence du phénotype tumoral ou immortalisé, une prolifération importante étant accompagnée d'un niveau élevé de protéine $HSAkin17$. D'un autre côté, un niveau élevé de protéine $HSAkin17$ pourrait être un pré-requis à la cancérogenèse. Il serait donc particulièrement intéressant d'analyser l'évolution du niveau de protéine $HSAkin17$ au cours du développement tumoral.

B) Rôle(s) de la protéine kin17 dans la réplication de l'ADN ?

En plus des résultats rappelés ci-dessus, d'autres observations concordent vers un rôle de la protéine $HSAkin17$ dans la réplication de l'ADN :

(i) La localisation de la protéine $HSAkin17$ endogène en foyers ponctuels intra-nucléaires rappelle celle de protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN (Article I).

(ii) La réduction de l'expression du gène $HSAKIN17$ (cellules RASK) entraîne une perturbation de la prolifération associée à une altération du cycle cellulaire (Article I).

Conclusions et Perspectives

(iii) La protéine $_{HSA}kin17$ est localisée aux sites de réplication de l'ADN (Article III). La majorité des foyers $_{HSA}kin17$ co-localisent avec les sites d'incorporation de BrdU visualisés en microscopie électronique.

(iv) La protéine $_{HSA}kin17$ interagit avec l'Ag T et sa sur-expression inhibe la réplication dépendant de l'Ag T dans un test *in vitro* (Miccoli et al., 2002).

(v) La protéine $_{HSA}kin17$ appartient au complexe de réplication de l'ADN et sa déplétion réduit l'activité du complexe *in vitro* (Miccoli et al., 2005).

Quel pourrait être le rôle de la protéine $_{HSA}kin17$ dans la réplication de l'ADN ?

La protéine $_{HSA}kin17$ s'associe avec les origines de réplication (Miccoli et al., 2005). Cette association est spécifique de la transition G1/S et persiste au cours de la phase S. La co-localisation ultra-structurale de la protéine $_{HSA}kin17$ et du BrdU persiste après 120 min (Article III) alors que la réplication dans un cluster dure environ 1 h (Manders et al., 1992). Dans des cellules synchrones, la protéine $_{HSA}kin17$ est recrutée dans la fraction des protéines associées aux structures nucléaires à l'initiation de la réplication et pendant toute la progression de la phase S (Article III). Ce profil d'expression est similaire à celui de certaines protéines associées avec l'initiation de la réplication (Ritzi et al., 1998). Enfin, la diminution de 75% de l'expression de la protéine $_{HSA}kin17$ dans des cellules RKO (cellules RASK) entraîne une entrée prématurée des cellules en phase S corrélée avec une accumulation en début et milieu de phase S ainsi qu'en phase G2 (Article I).

L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de la protéine $_{HSA}kin17$ dans l'initiation de la réplication, mais également dans sa phase d'élongation. En particulier, en restant associée aux origines de réplication au cours de la phase de synthèse de l'ADN, la protéine $_{HSA}kin17$ pourrait contrôler que la réplication n'est pas initiée plus d'une fois par cycle. L'association de la protéine $_{HSA}kin17$ à la matrice nucléaire dans les phases G1/S et S du cycle cellulaire (Miccoli et al., 2003) ainsi que sa capacité potentielle à modifier la structure chromatinienn

Conclusions et Perspectives

(discutée plus bas) pourraient permettre l'ancrage des complexes de réplication à la matrice nucléaire et participer au remodelage de la chromatine nécessaire à la réplication de l'ADN. La détermination des partenaires protéiques de la protéine HSAkin17 au sein du complexe de réplication et l'analyse de ses interactions avec la chromatine permettront d'apporter des éléments de réponse à ces questions.

2. La protéine kin17 dans la réponse aux atteintes génotoxiques

A) Association de la protéine kin17 avec la chromatine et dommages de l'ADN

Une fraction de la protéine HSAkin17 est étroitement associée *in vivo* avec la chromatine (Article I). Nous avons montré que la protéine HSAkin17 existe dans la cellule sous une forme soluble et sous une forme ancrée aux structures nucléaires (résistant à l'extraction par un détergent) (Article I). Le traitement par de nombreux agents génotoxiques entraîne une redistribution de la protéine HSAkin17 de la fraction soluble vers la fraction associée aux structures nucléaires (Articles I, II et III). D'autres protéines du métabolisme de l'ADN comme le PCNA et RPA présentent un comportement similaire après RI (Article I et Balajee and Geard, 2001).

Quand des cellules sont traitées en phase S du cycle cellulaire par un agent méthylant, la protéine HSAkin17 , qui est associée préférentiellement à la matrice nucléaire en l'absence de dommages de l'ADN, est recrutée sur la chromatine (Miccoli et al., 2003). Ce résultat renforce l'hypothèse de l'implication de la protéine HSAkin17 dans le métabolisme de l'ADN endommagé.

L'analyse par cytométrie en flux de cellules sur-exprimant de façon transitoire la protéine HSAkin17 suggère que cette sur-expression entraîne une altération de la structure de la

Conclusions et Perspectives

chromatine, la rendant plus accessible à l'iodure de propidium (Article II). La protéine *HSAkin17* pourrait donc participer au couplage entre réplication et réparation à travers le remodelage de la chromatine.

B) Réponse de la protéine *HSAkin17* à différents agents génotoxiques

De nombreux agents génotoxiques (RI, VP16, CPT, APH, HU, MIMO) entraînent (i) une augmentation de l'association de la protéine *HSAkin17* aux structures nucléaires et (ii) sa re-localisation dans de larges foyers intra-nucléaires (Articles I, II et III). Ces agents induisent un blocage des fourches de réplication et/ou des DSB et provoquent l'arrêt des cellules dans des phases différentes du cycle cellulaire. La réponse de la protéine *HSAkin17* ne dépend pas de son niveau endogène ou du phénotype *p53* (Article II). L'induction du gène *HSAKIN17* après UVC est également indépendante du phénotype *p53* (Masson et al., 2003).

La réponse de la protéine *HSAkin17* est observée aux temps tardifs après traitement (24 h). Ceci est en apparence contradiction avec des résultats obtenus précédemment après RI (Biard et al., 1997a; Masson et al., 2001; Tissier et al., 1995). Ces études ont été effectuées sur des cellules de rat BP ou par l'analyse de l'ARNm du gène *HSAKIN17* dans des cellules humaines. Les cellules de rat BP constituent un modèle très particulier puisque ces cellules proviennent d'une culture de poumons exposés au benzo[a]pyrène (Le Rhun et al., 1994). Ce composé est un carcinogène formant de gros adduits sur l'ADN et pourrait donc modifier la réponse aux autres stress génotoxiques. Désormais, (i) nous disposons d'anticorps monoclonaux nous permettant de mener une analyse plus spécifique du taux protéique de *HSAkin17*. La protéine *HSAkin17* étant impliquée dans la réplication de l'ADN, (ii) nous avons traité les cellules quatre jours après la mise en culture, afin de minimiser les effets de la prolifération. (iii) Nous avons analysé séparément la fraction soluble et la fraction associée aux structures nucléaires.

Conclusions et Perspectives

Enfin, (iv) nos résultats sont renforcés par l'utilisation de diverses lignées cellulaires humaines.

Il est intéressant de noter que le comportement de la protéine RPA70 est similaire à celui de la protéine *HSAkin17* suite à ces différents traitements. De plus, une partie de la protéine *HSAkin17* co-localise avec la protéine RPA70 24 h après RI (Article I). Différentes études suggèrent que les foyers où persistent RPA aux temps tardifs après irradiation correspondent à des lésions résiduelles de l'ADN (Golub et al., 1998; Kim et al., 2005; MacPhail and Olive, 2001). Le fractionnement de cellules H1299 traitées à l'HU a montré que le grossissement des foyers de protéine *HSAkin17* est corrélé à une augmentation de la masse moléculaire des complexes nucléaires contenant la protéine *HSAkin17* et le complexe RPA (Article III). Le blocage des fourches de réplication par l'HU entraîne la formation de DSB (Lundin et al., 2002). Nos résultats suggèrent que le blocage en G1/S et/ou les dommages induits par l'HU entraînent un remodelage des complexes nucléaires contenant la protéine *HSAkin17*. En particulier, la protéine *HSAkin17* pourrait appartenir au complexe HUIC (de *hydroxyurea induced complex*) qui est formé après traitement à l'HU et contient la protéine BRCA1 (Chiba and Parvin, 2001) ou à un complexe similaire.

C) Implication de la protéine *HSAkin17* dans la radiosensibilité

Nous avons montré que la réduction de l'expression du gène *HSAKIN17* par stratégie *antisens* (cellules RASK) sensibilisent les cellules RKO aux RI (Article II). Le niveau endogène de protéine *HSAkin17* varie fortement d'une lignée à l'autre. Cependant, ce niveau ne suffit pas à prédire la radiosensibilité. De plus, nous ne pouvons pas exclure que l'effet du déficit en protéine *HSAkin17* sur la radiosensibilité soit indirect. En effet, les cellules RASK s'accumulent dans des phases particulièrement sensibles du cycle cellulaire (Pawlik and Keyomarsi, 2004). Cependant, on peut noter que la protéine *HSAkin17* résiduelle dans les

Conclusions et Perspectives

cellules RASK n'est pas recrutée sur les structures nucléaires après RI contrairement à ce qu'il se passe dans les cellules de la lignée RKO (Article II).

Nous avons également obtenu la baisse d'expression du gène *HSAKIN17* par ARNi (cellules KIN17^{KD}). Ce système a permis de mettre en évidence une sensibilisation des cellules HeLa modérée aux faibles doses d'UVC et importantes à des doses plus élevées (Article IV). Cependant, de nombreuses expériences de croissance clonogénique n'ont pas mis en évidence d'augmentation de la sensibilité aux RI dans les cellules KIN17^{KD} (Biard, communication personnelle).

Sur quatre shRNA diminuant efficacement l'expression du gène *HSAKIN17*, trois entraînent une forte mortalité cellulaire et ne permettent pas l'établissement de clones dans la lignée HeLa. Cette observation renforce le caractère essentiel de la protéine kin17. Les clones obtenus avec la quatrième séquence présentent un niveau résiduel de protéine *HSAkin17* et une inhibition de la croissance cellulaire dans les deux premiers mois qui suivent la transfection (Article IV). Suite à cette phase de sélection délicate, les cellules KIN17^{KD} retrouvent une croissance quasi normale, ce qui suggère une compensation de la diminution du niveau de protéine *HSAkin17*. Les clones obtenus par la stratégie antisens, outre qu'ils dérivent d'une autre lignée cellulaire (RKO), présentent une grande instabilité et nous n'avons pas pu les maintenir suffisamment longtemps en culture pour qu'ils franchissent la phase de sélection. Cette différence de stabilité peut expliquer les résultats contradictoires obtenus avec les clones antisens et ARNi concernant la radiosensibilité. Le design de nouvelles séquences shRNA dirigées contre l'ARNm du gène *KIN17* pourrait permettre d'obtenir une meilleure extinction et potentiellement de retrouver la radiosensibilité observée avec les clones *antisens*.

D) Un rôle de la protéine *HSAkin17* dans la réponse aux DSB ?

Le NHEJ est considéré comme la voie prépondérante de réparation des DSB chez les eucaryotes supérieurs. Comme la protéine kin17 purifiée s'associe aux jonctions de

Conclusions et Perspectives

recombinaison illégitime (Mazin et al., 1994a), nous avons analysé son rôle éventuel dans le NHEJ par différentes approches (Article V, Résultats préliminaires). Nous n'avons pas réussi à démontrer une implication de la protéine $_{HSA}kin17$ dans cette voie de réparation. Cependant, le test de NHEJ *in vitro* utilisé ne prend pas en compte l'influence de la structure chromatinienne dans la réparation des DSB. S'il me semble improbable au vu des mes résultats que la protéine $_{HSA}kin17$ ait un rôle direct dans le NHEJ, elle pourrait néanmoins participer à des modifications chromatiniennes nécessaires à la réparation. Il serait donc intéressant d'étudier cet aspect en utilisant comme substrat des nucléosomes reconstitués dans le système *in vitro* présenté ci-dessus ou en étudiant la réparation de cassures directement induites dans le génome des cellules (champs pulsés ou substrat intégré portant un site de coupure pour l'enzyme I-SceI).

La protéine $_{HSA}kin17$ possède une région d'homologie immunologique avec la protéine bactérienne RecA dont l'homologue humain, la protéine Rad51, est la clé de voûte de la RH. La RH semble être le mécanisme prépondérant prenant en charge les fourches de réplication collapsées ou bloquées même en l'absence de DSB détectables (Helleday, 2003; Lundin et al., 2002). Nous avons montré que (i) la protéine $_{HSA}kin17$ est associée au complexe de réplication de l'ADN, (ii) son profil d'induction après traitement par des agents induisant un blocage des fourches et/ou des DSB est similaire à celui de RPA, complexe impliqué dans les étapes précoces de la RH et (iii) la $_{HSA}kin17$ s'accumule aux temps tardifs après traitement, au moment où les protéines Rad51 et RPA restent associés aux sites de dommages résiduels après irradiation par un laser à micro-faisceaux (Kim et al., 2005). Il me semble donc particulièrement intéressant d'étudier l'implication éventuelle de la protéine $_{HSA}kin17$ dans la RH. Dans ce but, nous pouvons envisager d'utiliser les opportunités offertes par l'irradiation localisée pour confirmer ou infirmer la présence de la protéine $_{HSA}kin17$ aux sites de lésions résiduelles et d'utiliser un des nombreux tests de RH disponibles dans des cellules déficientes

Conclusions et Perspectives

en protéine $_{HSA}kin17$. Un rôle de la protéine $_{HSA}kin17$ dans la RH ramènerait donc aux origines de la découverte de cette protéine.

Les dommages résiduels pourraient être directement responsables du recrutement de la protéine $_{HSA}kin17$ sur les structures nucléaires. D'un autre côté, la protéine $_{HSA}kin17$ appartenant au complexe de réplication de l'ADN, son accumulation pourrait être entraînée par le blocage des fourches de réplication au niveau de ces lésions non réparées. Quoiqu'il en soit, le fait que le changement de compartiment de la protéine $_{HSA}kin17$ en présence de dommages (de la matrice nucléaire vers la chromatine) et son implication dans la radiosensibilité plaide pour un rôle dans la prise en charge de l'ADN endommagé. De part ses propriétés supposées de remodelage de la chromatine et son rôle dans le complexe de réplication, la protéine $_{HSA}kin17$ pourrait participer (i) au couplage entre réparation et réplication, (ii) au maintien des fourches de réplication, (iii) à la ré-initiation de la réplication après blocage du cycle cellulaire et/ou (iv) à la synthèse trans-lésionnelle.

L'analyse des fonctions de la protéine $_{HSA}kin17$ est rendue particulièrement ardue par sa relative abondance et son implication dans de nombreux processus cellulaires (réplication, réparation, métabolisme de l'ARN). L'analyse de sa structure cristallographique entreprise au CEA Saclay pourrait fournir des pistes de réflexion intéressantes (le Maire et al., 2006). Enfin, il semble primordial de s'intéresser aux partenaires protéiques de la protéine $_{HSA}kin17$. Les approches visant des protéines particulières du métabolisme de l'ADN telles PCNA ou RPA devront être combinées à une approche plus globale tirant partie des possibilités offertes par la spectrométrie de masse.

Un modèle syngénique de cellules humaines pour l'étude des mécanismes de réparation de l'ADN : les exemples du NER et du NHEJ

La plupart des approches d'ARNi à long terme sont basées sur l'utilisation de vecteurs intégratifs ou de vecteurs viraux. Dans les travaux basés sur des vecteurs non viraux, le long terme reste d'ailleurs tout relatif, la période de stabilité étant généralement de quelques jours, rarement quelques semaines (Butz et al., 2003; Laposa et al., 2003; Paddison et al., 2002).

Les vecteurs pEBV-siRNA présentent des propriétés particulièrement intéressantes pour l'ARNi à long terme (Article IV) : (i) une efficacité en transitoire similaire à celle des siRNA duplex après optimisation des conditions de transfection avec l'avantage d'être peu onéreux ; (ii) une extinction du gène cible dans plus de 95% des cellules deux semaines après transfection contre 50% avec un vecteur intégratif ; (iii) une extinction du gène cible dans la majorité des clones isolés ; (iv) une extinction stable pendant plus de 450 jours de culture et après plusieurs cycles de congélation/décongélation des cellules ; (v) le maintien du phénotype associé à la perte de la protéine cible durant toute cette période et (vi) une extinction efficace dans plusieurs types cellulaires.

Le système d'ARNi basé sur les plasmides pEBV-siRNA développé par le Dr Denis Biard nous a permis d'obtenir des clones stables issus de la lignée HeLa et présentant des défauts spécifiques des voies NER (cellules XPA^{KD} et XPC^{KD}) ou NHEJ (cellules DNA-PKcs^{KD} et XRCC4^{KD}).

1. Validation du système de vecteurs pEBV-siRNA

En plus du suivi régulier de l'extinction du gène cible dans les clones KD sélectionnés, nous avons vérifié que ces clones présentaient les phénotypes attendus et que ces phénotypes étaient stables sur le long terme.

L'analyse de cellules dérivées de patients XP a énormément contribué à la compréhension des mécanismes du NER et à la connexion entre défauts de réparation de l'ADN, mutations et cancer. La réduction de l'expression des gènes *XPA* et *XPC* par les vecteurs pEBV-siRNA permet de mimer un phénotype XP dans la lignée HeLa :

- (i) Les cellules XPA^{KD} et XPC^{KD} sont sensibles aux UVC (Article IV).
- (ii) Cette sensibilité est associée à une réduction de l'UDS (Article IV).
- (iii) Les extraits de cellules XPA^{KD} et XPC^{KD} présentent une réduction de la réparation d'un plasmide irradié aux UVC dans un test de NER *in vitro* (Miccoli, communication personnelle).

Concernant le NHEJ, le choix des protéines DNA-PKcs et XRCC4 permet de cibler deux grandes étapes du NHEJ : la reconnaissance des extrémités d'ADN et l'activité kinase associée à travers DNA-PKcs ou la ligature des extrémités à travers XRCC4. Les cellules $DNA-PKcs^{KD}$ et $XRCC4^{KD}$ présentent les défauts attendus (Article V) :

- (i) Elles sont sensibles à de différents agents induisant des DSB (RI, VP16, NCS).
- (ii) Cette sensibilité aux DSB s'accompagne d'un défaut du NHEJ *in vitro*.
- (iii) La réduction de l'expression du gène *DNA-PKcs* entraîne la perte de l'activité kinase associée dans les cellules $DNA-PKcs^{KD}$.
- (iv) La réduction du niveau de protéine XRCC4 dans les cellules $XRCC4^{KD}$ s'accompagne d'une réduction du niveau de LigIV, en accord avec ce qui est observé chez le hamster (Bryans et al., 1999).

Conclusions et Perspectives

Nous avons donc démontré l'efficacité de notre système d'ARNi à reproduire les défauts biochimiques associés à l'altération des deux voies de réparation de l'ADN que sont le NER et le NHEJ. Les clones obtenus permettent de préciser, dans le même fond génétique, des aspects spécifiques de ces mécanismes et d'analyser leurs relations éventuelles. Ainsi, nous avons pu comparer les implications respectives des protéines XPA, XPC et *HSAkin17* dans la survie cellulaire après exposition aux UVC (Article IV). Les résultats obtenus sur les cellules DNA-PKcs^{KD} et XRCC4^{KD}, ainsi que sur les conséquences inattendues de la déficience en protéine XPC sur le NHEJ ouvrent des perspectives intéressantes sur l'interconnexion des voies de réparation de l'ADN.

2. Qu'apprend-on des cellules HeLa déficientes en NHEJ ?

Alors qu'il existe des syndromes causés par des mutations dans les gènes *ARTEMIS*, *LIG4* ou *CERNUNNOS-XLF* (voir Introduction), aucune maladie n'est pour l'heure associée à un défaut des gènes *XRCC4* et *DNA-PKcs* chez l'homme. La seule lignée humaine déficiente en protéine DNA-PKcs disponible (M059J) est issue d'un glioblastome hétérogène (Allalunis-Turner et al., 1993) et aucune lignée humaine déficiente en protéine XRCC4 n'a été isolée à ce jour. Les cellules DNA-PKcs^{KD} et XRCC4^{KD} fournissent donc un modèle original de déficience du NHEJ dans des cellules humaines.

A) Phosphorylation de la protéine XRCC4 après induction de DSB

Dans les cellules DNA-PKcs^{KD}, la protéine XRCC4 est hypo-phosphorylée après traitement à la CAL et à la NCS en comparaison avec les cellules « contrôle » et XRCC4^{KD} (Article V et Résultats additionnels). La phosphorylation résiduelle de XRCC4 peut provenir (i) d'une activité résiduelle de DNA-PKcs indétectable par le test de *pull-down* ou en l'absence de DSB induites *in vivo* ou (ii) de la phosphorylation par une autre kinase (par exemple ATM).

Conclusions et Perspectives

L'hypo-phosphorylation de la protéine XRCC4 est également observée dans des cellules où l'activité kinase de la DNA-PKcs est inhibée par la wortmannine avant traitement à la NCS (Drouet et al., 2005). Dans ces mêmes conditions, la protéine XRCC4 n'est ni mobilisée sur les structures nucléaires ni phosphorylée dans la lignée M059J (Drouet et al., 2005). Cette lignée est totalement déficiente en protéine DNA-PKcs mais présente également une mutation du gène *ATM* conduisant à l'expression d'une protéine tronquée (Tsuchida et al., 2002). La présence physique de la protéine DNA-PKcs serait donc nécessaire au recrutement du complexe assurant l'étape de ligature du NHEJ. De plus, elle participerait *in vivo* à la phosphorylation de la protéine XRCC4 consécutive à la formation de DSB.

Les doses d'agents inducteurs de DSB utilisées dans les expériences de recrutement sont élevées afin de pouvoir détecter la mobilisation des protéines sur les structures nucléaires par *Western blot*. En particulier, Drouet et collaborateurs utilisent couramment 1 μ M de NCS alors que la survie des cellules HeLa « contrôle » n'est que de 20% pour une dose mille fois moins importante (Article V). Il a été établi qu'en nombre de DSB formées 1 nM de NCS était équivalent à une irradiation à 1,2 Gy et que le nombre de DSB augmentait de façon linéaire avec la dose au moins jusqu'à 30 nM de NCS (Noel et al., 2003). Il serait intéressant d'étudier les modifications post-traductionnelles de XRCC4 dans des conditions permettant la survie cellulaire afin de mettre en évidence ce qui relève effectivement d'un processus de réparation. Les cellules DNA-PKcs^{KD}, de part la disparition quasi-totale de protéine DNA-PKcs et de l'activité kinase correspondante, constituent un outil biologique intéressant pour l'étude de l'implication *in vivo* de la kinase DNA-PKcs dans la phosphorylation de ses autres cibles putatives.

Conclusions et Perspectives

B) Les protéines DNA-PKcs et XRCC4 sont impliquées dans la réparation des DSB induites par l'étoposide

Un modèle est généralement avancé pour la génération des lésions cytotoxiques induites par les inhibiteurs de la topoisomérase II (topoII). L'arrivée de la fourche de réplication ou de l'hélicase qui lui est associée détruit le complexe inhibiteur/topoII/ADN (*cleavage complex*), révélant la DSB scellée par l'inhibiteur. Cependant, certains résultats suggèrent que les DSB sont produites par le clivage des fourches de réplication bloquées par le *cleavage complex* par une endonucléase (Hong and Kreuzer, 2003). Les voies impliquées dans la réparation de ces DSB chez les vertébrés sont en cours de caractérisation. Certains auteurs soulignent l'importance de la RH dans ce mécanisme (Adachi et al., 2005; Lundin et al., 2003), en accord avec ce qui est observé chez la levure (Sabourin et al., 2003). D'autres résultats sont en faveur d'une prépondérance du NHEJ : (i) Les cellules de poulet DT40 déficientes en protéines clé du NHEJ sont hypersensibles au VP16 alors que les cellules DT40 Rad54^{-/-} présentent une sensibilité modérée (Adachi et al., 2004; Adachi et al., 2003) ; (ii) un inhibiteur spécifique de la DNA-PKcs augmente la cytotoxicité du VP16 dans des cellules de leucémie humaine, indiquant que le NHEJ dépendant de DNA-PK serait impliqué dans la réparation des DSB induit par VP16 (Willmore et al., 2004) ; (iii) le VP16 entraîne la formation de foyers associés à la matrice nucléaire et contenant l'histone γ -H2AX et les protéines clé du NHEJ (Kantidze et al., 2006). Il est probable que les deux voies contribuent à la survie cellulaire après exposition au VP16. L'hypersensibilité des cellules DNA-PKcs^{KD} et XRCC4^{KD} confirme l'implication du NHEJ dépendant de DNA-PK dans la réparation des DSB induites par le VP16 dans les cellules humaines (Article V).

Conclusions et Perspectives

C) Radiosensibilité des cellules DNA-PKcs^{KD} et XRCC4^{KD} et NHEJ in vitro

Le système de NHEJ *in vitro* utilisé ici est fortement dépendant des protéines DNA-PKcs et XRCC4. En effet, il est sensible à la wortmannine et présente une réduction importante d'efficacité dans les extraits de cellules DNA-PKcs^{KD} et XRCC4^{KD} (Article V et Résultats préliminaires). Deux études indépendantes réalisées suivant ce protocole montrent l'absence de réparation dans des extraits de cellules M059J (Deriano et al., 2005; Merel et al., 2002). L'activité de réparation résiduelle observée dans les cellules DNA-PKcs^{KD} et XRCC4^{KD} (essentiellement formation de dimères linéaires) peut provenir d'un niveau résiduel des protéines DNA-PKcs ou XRCC4. Il est possible que ces jonctions soient obtenues par une voie alternative du NHEJ indépendante de DNA-PKcs et/ou XRCC4. Une activité résiduelle a déjà été observée dans les mêmes conditions dans des extraits de cellules de hamster déficientes en Ku (Feldmann et al., 2000). Il convient toutefois de noter que la déficience en protéine DNA-PKcs est moins préjudiciable à l'efficacité du NHEJ *in vitro* que la déficience en protéine XRCC4 dans les cellules de hamster (Pfeiffer, communication personnelle). Ce n'est pas le cas dans les cellules HeLa KD où la baisse d'activité NHEJ est comparable en l'absence de DNA-PKcs ou de XRCC4. Cette dissemblance peut être expliquée par le fait que les cellules de rongeur et les cellules humaines présentent des niveaux de protéine DNA-PKcs et des activités NHEJ différents (Daza et al., 1996). De plus, il existe une différence du niveau d'extinction des gènes *XRCC4* et *DNA-PKcs* par les vecteurs pEBV-siRNA. Les cellules HeLa XRCC4^{KD} conservent un niveau résiduel de protéine XRCC4. La difficulté à diminuer l'expression de ce gène peut s'expliquer par son caractère essentiel.

Dans les cellules XRCC4^{KD}, la ligature intra-moléculaire est réduite à un niveau indétectable (Article V). La microscopie électronique a montré que le complexe DNA-PK favorise la circularisation de l'ADN linéaire puisque 30% des molécules d'ADN forment des cercles en présence de DNA-PK_{CS} et Ku purifiées (DeFazio et al., 2002). La protéine XRCC4 pourrait

Conclusions et Perspectives

être nécessaire à la formation ou au maintien de ces structures circulaires avant la complétion de la ligature. Différents résultats impliquent la protéine XRCC4 dans l'étape de modification des extrémités nécessaire à la ligature (Koch et al., 2004; Lee et al., 2003). Il est plausible que la protéine XRCC4, par des interactions avec l'ADN et d'autres protéines impliquées dans le NHEJ, favorise le maintien des extrémités d'ADN et l'accès des activités enzymatiques nécessaires à leur jonction. Les jonctions intra-moléculaires seraient particulièrement affectée par le déficit en protéine XRCC4 car plus difficiles à maintenir pour des raisons de contraintes mécaniques.

La signification biologique des jonctions inter- et intra-moléculaires n'est toutefois pas évidente. En particulier, nous avons noté que la radiosensibilité n'est pas corrélée avec la capacité de re-circularisation des extraits puisque les cellules DNA-PKcs^{KD}, qui conservent une faible activité de re-circularisation, sont plus sensibles aux RI que les cellules XRCC4^{KD} (Article V). De plus, les deux clones présentent des activités NHEJ résiduelles comparables. L'analyse du NHEJ *in vitro* dans des lignées tumorales présentant différentes sensibilités aux RI a montré que la radiosensibilité n'est pas corrélée à l'efficacité mais à la fidélité de réparation (Britten et al., 1997). Il serait donc particulièrement intéressant de séquencer les jonctions obtenues dans les extraits de cellules « contrôle », DNA-PKcs^{KD} et XRCC4^{KD}. Ceci pourrait également permettre d'élucider par quelle voie elles ont été formées.

Le phénotype murin associé à la perte des protéines XRCC4 et LigIV (mortalité embryonnaire) est plus sévère que celui rencontrée dans des souris Ku^{-/-} ou DNA-PKcs^{-/-} (pas de mortalité embryonnaire). En particulier, de nombreux résultats suggèrent que la protéine DNA-PKcs n'est qu'accessoire pour la réparation d'un certains nombres de cassures (voir Introduction). A première vue, il est donc étonnant que les cellules DNA-PKcs^{KD} soient plus sensibles aux RI que les cellules XRCC4^{KD} (12 et 5 fois respectivement à 2 Gy) (Article V). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : (i) la protéine XRCC4 résiduelle dans les

Conclusions et Perspectives

cellules XRCC4^{KD}, qui est correctement phosphorylée et recrutée sur les structures nucléaires endommagées, suffit à assurer une survie relative après RI ; (ii) dans les cellules DNA-PKcs^{KD}, l'absence d'activité kinase de DNA-PKcs et/ou l'hypo-phosphorylation de XRCC4 après induction de DSB affecte particulièrement la survie cellulaire ; (iii) le complexe DNA-PK étant candidat au maintien et à la protection des extrémités d'ADN (Feldmann et al., 2000), l'absence de la protéine DNA-PKcs aurait des conséquences sur la précision de la réparation.

La protéine DNA-PKcs, associée à la nucléase Artemis et sous le contrôle d'ATM, serait impliquée dans la réparation d'un pourcentage de DSB formées par les RI, faible (10%) mais particulièrement délétère (Jeggo and Lobrich, 2005). La radiosensibilité élevée des cellules DNA-PKcs^{KD}, ainsi que la persistance des foyers γ -H2AX 24 h après irradiation dans cette lignée, est en accord avec cette hypothèse. Le clone DNA-PKcs^{KD} présente en outre une proportion de grosses cellules multinuclées croissant avec le temps en culture (Biard, communication personnelle). Cette caractéristique a été observée dans des cellules de cancer du colon (HCT 116) après inactivation d'un allèle du gène *KU80* (Li et al., 2002) et témoignerait de l'accumulation de dommages de l'ADN d'origine endogène. Les résultats obtenus avec les cellules DNA-PKcs^{KD} soulignent l'importance de la protéine DNA-PKcs dans le NHEJ et dans la survie cellulaire après exposition à un agent inducteur de DSB.

3. Un modèle pour l'étude des relations entre mécanismes de réparation : l'exemple de la protéine XPC

Nous avons montré que la réduction de l'expression du gène *XPC* dans les cellules HeLa entraîne une altération du NHEJ (modification du spectre de réparation *in vitro* et phosphorylation de XRCC4 à des doses plus faibles de CAL *in vivo*) ainsi qu'une sensibilisation au VP16 (Article V). Ce type d'effet a déjà été observé dans les cellules de

Conclusions et Perspectives

cancers colorectaux déficientes en MMR. Ces cellules sont sensibles au VP16 et présentent une altération du NHEJ (Jacob et al., 2001; Koh et al., 2005). Des résultats obtenus par complémentation de fibroblastes immortalisés de patient XP-C montrent que la restauration d'un niveau normal de protéine suffit à corriger la réparation des CPD et des 6-4 PP (Emmert et al., 2000). Or, quand les cellules XPC^{KD} sont cultivées en l'absence de pression de sélection pendant plusieurs jours, elles retrouvent un niveau normal de protéine XPC mais conservent une sensibilité significative aux UVC, ce qui indique que la diminution de l'expression du gène dans une lignée normalement proficiente pourrait avoir des conséquences irréversibles à long terme (Article IV). Nos résultats suggèrent que le rôle de la protéine XPC n'est pas limité à l'initiation du NER. La protéine XPC pourrait être impliquée dans un mécanisme global de réponse aux dommages de l'ADN, en accord avec une hypothèse émise par de nombreux auteurs (Araki et al., 2001; Chen et al., 2003; Hoogervorst et al., 2005; Molinier et al., 2004; Nahari et al., 2004; Ng et al., 2003; Shimizu et al., 2003; Wang et al., 2004a; Wijnhoven et al., 2000).

Les cellules XPC^{KD} sont sensibles au VP16, mais pas aux RI et à la NCS. Nous avons toutefois montré que la réduction du niveau de protéine XPC entraîne une intolérance à des doses plus élevées de RI. Le mode de fonctionnement de ces agents est différent. En effet, les RI induisent des DSB par dépôt d'énergie ou par génération de ROS. La NCS fonctionne dans une réaction suicide rapide qui entraîne sa disparition en quelques minutes (Noel et al., 2003). Le VP16, quant à lui, forme un complexe avec l'ADN clivé par la topoII. La protéine XPC pourrait être impliquée dans la détection et la prise en charge de ce triplex VP16/topoII/ADN. Cette hypothèse est renforcée par une étude récente qui montre que les protéines XPC et XPA sont capables de détecter le pontage de petits polypeptides sur l'ADN et que ces lésions sont ensuite excisées par le NER (Reardon and Sancar, 2006). Le fait que les cellules XPA^{KD} présentent une réponse aux DSB similaires à celle des cellules contrôle suggère que les

Conclusions et Perspectives

défauts observés dans les cellules XPC^{KD} ne sont pas liés à un défaut global du NER mais plus probablement à une caractéristique intrinsèque de la protéine XPC. Le rôle de la protéine XPC dans la réparation des lésions induites par le VP16 reste à déterminer. Nous avons tenté de compléter directement les cellules XPC^{KD} en y introduisant un plasmide portant l'ADNc du gène *XPC*. Cependant, la grande efficacité des vecteurs pEBV-siRNA entraîne la dégradation de l'ARNm de *XPC* d'origine exogène. La purification de la protéine XPC humaine en cours au laboratoire permettra de vérifier si la complémentation d'extraits de cellules XPC^{KD} restaure une activité NHEJ normale.

Nous avons analysé l'évolution du taux protéique de XPC après traitement par des agents formant des DSB de façon très spécifique (NCS, CAL et VP16). La protéine XPC, étroitement associée aux structures nucléaires en l'absence de dommages de l'ADN, est dégradée suite à la formation d'un nombre important de DSB (Article V). Les ARNm des gènes *XPC* et *XPE* sont induits 24 à 48 h après exposition de cellules humaines à de faibles doses de rayons γ (0,2 à 2 Gy) (Amundson et al., 2000). Ce résultat n'est pas incompatible avec les nôtres, puisque nous avons analysé le niveau de protéine XPC à des temps précoces après exposition à des doses importantes d'inducteurs de DSB plus spécifiques que les RI. De plus, l'expression des gènes *XPC* et *XPE* est régulée par la protéine p53 (Adimoolam and Ford, 2002; Hwang et al., 1999). L'induction de ces gènes après RI pourrait n'être qu'une conséquence d'une réponse p53 plus globale. Les cellules HeLa utilisées ici sont infectées par le papillomavirus dont la protéine E6 dégrade la protéine p53. Le mécanisme assurant la baisse du niveau de protéine XPC après induction de DSB reste à déterminer. Nous pouvons envisager l'implication du système ubiquitine/protéasome 26S qui joue un rôle important dans l'étape de reconnaissance des lésions du NER (El-Mahdy et al., 2006; Groisman et al., 2003; Sugawara et al., 2005; Wang et al., 2005b).

Conclusions et Perspectives

Le fait que la réduction du niveau de protéine XPC affecte le NHEJ *in vitro*, sensibilise les cellules HeLa au VP16 et altère le cycle cellulaire après exposition aux RI suggère que la dégradation de la protéine XPC peu de temps après la formation de DSB pourrait constituer une étape du processus de signalisation et/ou de réparation en tant que telle. Des travaux récents ont montré que la kinase ATM est impliquée dans la survie cellulaire de fibroblastes humains traités au cisplatine et interagit avec des protéines du NER. De plus, la présence d'une protéine XPC fonctionnelle semble nécessaire à l'association de ATM avec l'ADN génomique (Colton et al., 2006). Ce dernier résultat permet d'envisager que la protéine XPC pourrait participer, en complément d'autres senseurs de dommages de l'ADN comme le complexe MRN, à l'activation du réseau de signalisation gouverné par la kinase ATM en réponse aux DSB de l'ADN.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai contribué à la caractérisation du système d'ARNi mis au point par le Dr Denis Biard en démontrant qu'il pouvait instaurer un défaut de NHEJ dans les cellules HeLa. Les résultats que j'ai obtenus concernant la protéine XPC soulignent l'intérêt d'étudier les interactions entre mécanismes de réponse aux atteintes génotoxiques et l'utilité de ce système dans cette entreprise. Afin d'obtenir un large panel de clones présentant des défauts de la réponse aux dommages de l'ADN, nous avons ciblé des protéines de signalisation (p53, ATM), du TCR (CSA, CSB), du GGR (HR23A, HR23B, XPC), du NER (XPA), de la RH (Rad50, Mre11, Nbs1), du NHEJ (DNA-PKcs, XRCC4) et du BER (LigIII). Nous développons également des vecteurs inductibles afin de réduire l'expression de protéines essentielles dans les cellules humaines comme Ku70 et Ku80 (Li et al., 2002). Ces clones pourraient se révéler particulièrement intéressants dans différentes approches.

- L'obtention d'un modèle syngénique de déficience du NHEJ permettra d'étudier la contribution des protéines clé de ce mécanisme à l'efficacité et à la précision de la

Conclusions et Perspectives

réparation. De telles études ont déjà été menées sur des mutants de rongeur (KO murins et cellules de hamster). Cependant, si ils ont permis de mieux comprendre les mécanismes du NHEJ, ces modèles ne sont pas entièrement satisfaisants car il existe des différences entre le rongeur et l'homme (Daza et al., 1996).

- L'obtention de cellules déficientes en protéines XRCC1, PARP1 ou LigIII offrira un outil pour l'étude de l'implication de ces protéines dans d'éventuelles voies alternatives du NHEJ. Nous avons vu que de nombreux résultats indiquent l'existence de voies NHEJ indépendantes de DNA-PK et les trois protéines ci-dessous constituent des candidats intéressants. Le système d'ARNi décrit ici pourrait constituer un modèle pratique pour déterminer la contribution du NHEJ alternatif dans la survie cellulaire.
- Enfin, il apparaît de plus en plus évident que les mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN ne sont pas cloisonnés mais forment un réseau étroitement imbriqué. Ce constat est clair dans le cas de lésions complexes. La prise en charge des pontages inter-brins, par exemple, impliquent des protéines du NER comme XPD et XPF/ERCC1 et des protéines de la recombinaison comme Rad51 et Rad52. Le processus de réparation est régulé par des interactions physiques et fonctionnelles entre ces différents acteurs (Aloyz et al., 2002; Motycka et al., 2004; Niedernhofer et al., 2004). Certains auteurs suggèrent l'existence de complexes multi-protéiques comme le complexe BASC regroupant différentes activités de détection des structures aberrantes de l'ADN (Wang et al., 2000). Notre système d'ARNi pourrait servir de modèle pour l'étude des connexions entre les différents mécanismes de réparations, en particulier dans les étapes de détection et de signalisation des lésions de l'ADN.

Matériel

Et

Méthodes

Matériel et Méthodes

1. Test de NHEJ *in vitro*

Préparation des extraits protéiques

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes de 10 cm de diamètre et récupérées par trypsination à 80-90% confluence. Elles sont conservées dans 50% de sérum de veau foetal et 10% de DMSO dans l'azote liquide jusqu'à la préparation des extraits protéiques selon un protocole décrit précédemment avec de légères modifications (Daza et al., 1996; Pfeiffer et al., 2005).

Toutes les étapes sont effectuées à 4°C. Pour chaque préparation, un nombre équivalent de cellules (100 à 150 millions) est décongelé et rincé deux fois dans du PBS (*phosphate buffer saline*) froid. La taille du culot cellulaire (*packed cell volume*, PCV) est estimée. Les cellules sont resuspendues dans 4 PCV d'une solution hypotonique (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA pH 8 1 mM, β -mercaptoéthanol 10 mM, inhibiteurs de protéases Complete (Roche)) et placées sur glace jusqu'à ce que 80 à 90% des noyaux soient séparés de leur cytoplasme tout en restant intacts (HEK 293 : 5 min, RKO : 10 min, HeLa : 40 min ; XP44RO : 20 min). Si nécessaire, les cellules sont homogénéisées (Dounce pilon B, HeLa : 4 aller-retour, XP44RO : 1 aller-retour). Des inhibiteurs de protéase sont ajoutés avant l'addition de 4 PCV d'une solution hypertonique (glycérol 50%, sucrose 25%, Tris-HCl pH 8 50 mM, MgCl₂ 10 mM, β -mercaptoéthanol 4 mM). Les phases sont mélangées doucement et 0,8 PCV d'une solution

Matériel et Méthodes

saturée de sulfate d'ammonium pH 7 est ajoutée. L'échantillon est précipité 30 min sous agitation douce et centrifugé à 215 000 g pendant 45 min dans un rotor à angle fixe.

Le surnageant (*high speed supernatant*, HSS) est transféré dans un bécher de 10 ml et supplémenté par du sulfate d'ammonium en poudre à raison de 0,33 g par ml de HSS. La solution est neutralisée par l'addition de soude 1 M (10 µl par g de sulfate d'ammonium) et placée sous agitation douce pendant 30 min. L'échantillon est centrifugé à 25 000 g pendant 30 min. Le culot est resuspendu dans 1/20^{ème} de HSS dans le tampon de stockage (glycérol 20%, Tris-HCl pH 8 30 mM, KCl 90 mM, β-glycérophosphate pH 7 10 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA pH 8 1 mM, EGTA pH 8 2 mM, β-mercaptoéthanol 2 mM, PMSF 0,5 mM), dialysé contre ce tampon et centrifugé à 20 000 g pendant 5 min. La concentration en protéines est déterminée par Bradford et les aliquotes d'extrait sont conservées dans l'azote liquide.

Substrats d'ADN

Les substrats avec des extrémités cohésives ou franches dérivent de la digestion par une enzyme de restriction du plasmide pSP65 (3 kb ; Promega) : 5'-coh. (BamH I), 3'-coh. (Pst I) et fr. (Sma I). Les substrats présentant des extrémités non complémentaires sont issus de la digestion par deux enzymes de restriction d'une version modifiée de pSP65 contenant un insert λ entre les deux sites de restriction utilisés (4,2 kb ; pSP65/λ) : 5'/5' (Bam HI / Asp 718), 3'/3' (BstX I / BstX I), 5'/fr. (Ava I / Hinc II), 3'/fr. (Sma I / Pst I) et 5'/3' (BamH I / Pst I) (Pfeiffer et al., 1994).

Les digestions sont séparées sur gel d'agarose 1% et la complétion de la digestion est vérifiée. Les substrats sont excisés, purifiés (kit GeneClean II, Q-BIOgene) et dilués à 10 ng/µl dans du tampon TE.

Matériel et Méthodes

Réaction NHEJ

La quantité appropriée d'extraits est diluée à 5 µg/µl dans le tampon de stockage puis dialysée contre le tampon de réaction (3-(N-morpholino)-2-hydroxypropane acide sulfonique (MOPSO)-NaOH pH 7,5 50 mM, KCl 40 mM, MgCl₂ 10 mM, β-mercaptoéthanol 5 mM) sur un filtre de microdialyse (White VSWP, 25 mm, 0,025 µm, Millipore) pendant 30 min à 4°C.

La réaction standard a lieu dans un volume total de 10 µl contenant 8 µl d'extrait protéique dialysé (40 µg de protéines), 1 µl de substrat (10 ng) et 1 µl de tampon LNB (Tris-HCl pH 8 10 mM, MgCl₂ 1,2 mM, KCl 10 mM, β-mercaptoéthanol 1 mM, ATP pH 7 10 mM, dNTPs 2 mM (soit 0,5 mM de chaque), BSA 0,5 mg/ml). Les échantillons sont incubés à 25°C pendant 6 h.

La réaction est stoppée par l'addition de 10 µl de Tris-HCl pH 7,5 40 mM, EDTA 2 mM, SDS 2 mM et l'incubation à 65°C pendant 10 min. Les échantillons peuvent être conservés à -20°C jusqu'à l'analyse des produits de réparation.

Analyse des produits de réparation NHEJ

L'équivalent de 2 ng de substrat est déprotéinisé (protéinase K, 2 mg/ml, 30 min à 37°C puis 15 min à 65°C) et séparé sur gel d'agarose 1% contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium afin de séparer les monomères linéaires et circulaires. L'ADN est transféré sur une membrane Hybond N⁺ (Amersham) et hybridé avec une sonde spécifique de pSP65 marquée au [α -³²P]dCTP (kit *Ready-to-go* de *random priming*, Amersham). L'autoradiographie est effectuée par imagerie phosphore (Storm SystemTM, Amersham Biosciences). L'ADN est quantifié à l'aide du logiciel ImageQuant (version 5.0). Pour chaque réaction, l'intensité d'une bande (i.e. d'un type de produit) est normalisée au total de radioactivité chargé dans le puits. L'efficacité du NHEJ est définie comme la somme des produits multimériques linéaires et monomériques circulaires et est exprimée en pourcentage du substrat de départ.

2. EMSA

Préparation des extraits protéiques

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes de 10 cm de diamètre et récupérées par trypsination avant d'atteindre la confluence. Les cellules sont comptées et rincées deux fois dans du PBS. Elles sont lysées dans 100 µl pour 10⁶ cellules de tampon de lyse (NaF 50 mM, HEPES pH 7,8 20 mM, NaCl 450 mM, glycérol 25%, EDTA 0,2 mM, β-mercaptoéthanol 1 mM, inhibiteurs de protéases Complete) par trois passages successives dans un mélange de carboglace et d'éthanol suivi d'une décongélation à 30°C. Les extraits sont centrifugés 15 min à 20 000 g à 4°C. Le surnageant est aliquoté et les protéines sont quantifiées par Bradford. Les aliquotes sont conservées à -80°C.

Préparation de la sonde

Les deux brins de la sonde A3/4 (5'-CCTCAAATGGTCTCCAATTTTCCTTTGGCAAATTCC-3') sont synthétisés par Proligo. Ils sont ensuite marqués en 5' par incorporation de [γ^{32} -P]ATP par la T4 polynucléotide kinase (Promega). Les nucléotides libres sont éliminés par passage sur une colonne MicroSpin G-25 (Amersham). Les deux brins sont ensuite hybridés pendant 1 h à 37°C. La sonde peut être conservée à -20°C.

Interaction ADN-protéines

La réaction s'effectue dans un volume total de 20 µl comprenant 5 µg de protéines et 4 pg de sonde dans du Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 50 mM et glycérol 10%. La réaction est incubée 20 min à température ambiante. Pour obtenir le *super shift*, 1 µl d'anticorps anti-Ku80 (20 ng) est ajouté et la réaction est incubée 10 min supplémentaires. L'ADN est séparé sur gel de polyacrylamide 5% non dénaturant dans du TBE 0,5x à 100 V pendant 1 h. La radioactivité est visualisée par imagerie phosphore.

3. Mesure de l'activité kinase de DNA-PKcs

La mesure de l'activité kinase de DNA-PKcs est réalisée selon un protocole déjà décrit (Finnie et al., 1995).

Préparation des extraits protéiques

Les extraits sont obtenus comme décrit pour l'EMSA.

Pull-down

Pour chaque réaction, 5 mg d'ADN double-brin/cellulose (Amersham) est équilibré dans le tampon kinase (HEPES pH 7,8 25 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, glycérol 20%, NP-40 0,1%, β-mercaptoéthanol 2 mM). L'équivalent de 25 µg de protéines est ajouté à l'ADN/cellulose et le volume est ramené à 200 µl. L'échantillon est placé sur roue à 4°C pendant 30 min. Le culot de cellulose est rincé deux fois dans le tampon kinase. Après la dernière centrifugation, le tampon résiduel est enlevé avec soin.

Test d'activité kinase de DNA-PKcs

Le culot de cellulose est repris dans un volume de 20 µl de tampon kinase additionné de 4 nmol de peptide cible de DNA-PKcs (EPPLSQEAFADLWKK, Promega), de 80 nM ATP et de [γ -³²P]ATP (0,8 µCi). Des réactions identiques privées de peptide et/ou de protéines servent de contrôles négatifs. 50 unités de DNA-PKcs purifiée (Promega) activée par 5 mg d'ADN/cellulose servent de contrôle positif. La réaction est incubée 10 min à 30°C, centrifugée brièvement puis le surnageant est transféré sur un filtre (Whatman P81). Le peptide est fixé dans l'acide acétique 15% et le filtre est rincé plusieurs fois. La radioactivité incorporée est mesurée par scintillation liquide.

Références

Références bibliographiques

A

- Adachi, N., Iizumi, S., and Koyama, H. (2005). Evidence for a role of vertebrate Rad52 in the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *DNA Cell Biol* 24, 388-393.
- Adachi, N., Iizumi, S., So, S., and Koyama, H. (2004). Genetic evidence for involvement of two distinct nonhomologous end-joining pathways in repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 856-861.
- Adachi, N., Suzuki, H., Iizumi, S., and Koyama, H. (2003). Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *J Biol Chem* 278, 35897-35902.
- Adimoolam, S., and Ford, J. M. (2002). p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12985-12990.
- Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124, 301-313.
- Aiyar, A., Tyree, C., and Sugden, B. (1998). The plasmid replicon of EBV consists of multiple *cis*-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J* 17, 6394-6403.
- Allalunis-Turner, M. J., Barron, G. M., Day, R. S., 3rd, Dobler, K. D., and Mirzayans, R. (1993). Isolation of two cell lines from a human malignant glioma specimen differing in sensitivity to radiation and chemotherapeutic drugs. *Radiat Res* 134, 349-354.
- Allen, C., Halbrook, J., and Nickoloff, J. A. (2003). Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. *Mol Cancer Res* 1, 913-920.
- Allen, C., Kurimasa, A., Brenneman, M. A., Chen, D. J., and Nickoloff, J. A. (2002). DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3758-3763.
- Aloyz, R., Xu, Z. Y., Bello, V., Bergeron, J., Han, F. Y., Yan, Y., Malapetsa, A., Alaoui-Jamali, M. A., Duncan, A. M., and Panasci, L. (2002). Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TFIIH subunit XPD. *Cancer Res* 62, 5457-5462.
- Amundson, S. A., Do, K. T., Shahab, S., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., and Fornace, A. J., Jr. (2000). Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 154, 342-346.
- Anderson, D. G., and Kowalczykowski, S. C. (1998). Reconstitution of an SOS response pathway: derepression of transcription in response to DNA breaks. *Cell* 95, 975-979.
- Angulo, J. F., Moreau, P. L., Maunoury, R., Laporte, J., Hill, A. M., Bertolotti, R., and Devoret, R. (1989). Kin, a mammalian nuclear protein immunologically related to E. coli RecA protein. *Mutat Res* 217, 123-134.
- Angulo, J. F., Rouer, E., Mazin, A., Mattei, M. C., Tissier, A., Horellou, P., Benarous, R., and Devoret, R. (1991). Identification and expression of the cDNA of Kin17, a zinc finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* 19, 5117-5123.
- Aoufouchi, S., Flatter, E., Dahan, A., Faili, A., Bertocci, B., Storck, S., Delbos, F., Cocea, L., Gupta, N., Weill, J. C., and Reynaud, C. A. (2000). Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic Acids Res* 28, 3684-3693.
- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugawara, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. (2001). Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 276, 18665-18672.

Références bibliographiques

Arlett, C. F., Harcourt, S. A., Lehmann, A. R., Stevens, S., Ferguson-Smith, M. A., and Morley, W. N. (1980). Studies on a new case of xeroderma pigmentosum (XP3BR) from complementation group G with cellular sensitivity to ionizing radiation. *Carcinogenesis* 1, 745-751.

Arlett, C. F., Plowman, P. N., Rogers, P. B., Parris, C. N., Abbaszadeh, F., Green, M. H., McMillan, T. J., Bush, C., Foray, N., and Lehmann, A. R. (2006). Clinical and cellular ionizing radiation sensitivity in a patient with xeroderma pigmentosum. *Br J Radiol* 79, 510-517.

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

B

Balajee, A. S., and Geard, C. R. (2001). Chromatin-bound PCNA complex formation triggered by DNA damage occurs independent of the ATM gene product in human cells. *Nucleic Acids Res* 29, 1341-1351.

Bannister, L. A., Waldman, B. C., and Waldman, A. S. (2004). Modulation of error-prone double-strand break repair in mammalian chromosomes by DNA mismatch repair protein Mlh1. *DNA Repair (Amst)* 3, 465-474.

Batty, D., Rasic'Otrin, V., Levine, A. S., and Wood, R. D. (2000). Stable binding of human XPC complex to irradiated DNA confers strong discrimination for damaged sites. *J Mol Biol* 300, 275-290.

Bau, D. T., Mau, Y. C., and Shen, C. Y. (2005). The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. *Cancer Lett*.

Baumann, P., and West, S. C. (1998). DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14066-14070.

Bertocci, B., De Smet, A., Berek, C., Weill, J. C., and Reynaud, C. A. (2003). Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity* 19, 203-211.

Biard, D. S., Kannouche, P., Lannuzel-Drogou, C., Mauffrey, P., Apiou, F., and Angulo, J. F. (1999). Ectopic expression of (Mm)Kin17 protein inhibits cell proliferation of human tumor-derived cells. *Exp Cell Res* 250, 499-509.

Biard, D. S., Saintigny, Y., Maratrat, M., Paris, F., Martin, M., and Angulo, J. F. (1997a). Enhanced expression of the Kin17 protein immediately after low doses of ionizing radiation. *Radiat Res* 147, 442-450.

Biard, D. S., Saintigny, Y., Maratrat, M., Vozenin, M. C., Martin, M., Daburon, F., and Angulo, J. F. (1997b). Differential expression of the HsKin17 protein during differentiation of in vitro reconstructed human skin. *Arch Dermatol Res* 289, 448-456.

Blanco, M. G., Boan, F., and Gomez-Marquez, J. (2004). A paradox in the in vitro end-joining assays. *J Biol Chem* 279, 26797-26801.

Blattner, C., Kannouche, P., Litfin, M., Bender, K., Rahmsdorf, H. J., Angulo, J. F., and Herrlich, P. (2000). UV-induced stabilization of c-fos and other short-lived mRNAs. *Mol Cell Biol* 20, 3616-3625.

Block, W. D., Yu, Y., Merkle, D., Gifford, J. L., Ding, Q., Meek, K., and Lees-Miller, S. P. (2004). Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends. *Nucleic Acids Res* 32, 4351-4357.

Boskovic, J., Rivera-Calzada, A., Maman, J. D., Chacon, P., Willison, K. R., Pearl, L. H., and Llorca, O. (2003). Visualization of DNA-induced conformational changes in the DNA repair kinase DNA-PKcs. *Embo J* 22, 5875-5882.

Bouquet, F., Muller, C., and Salles, B. (2006). The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell Cycle* 5, 1116-1122.

Bowater, R., and Doherty, A. J. (2006). Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet* 2, e8.

Britten, R. A., Liu, D., Kuny, S., and Allalunis-Turner, M. J. (1997). Differential level of DSB repair fidelity effected by nuclear protein extracts derived from radiosensitive and radioresistant human tumour cells. *Br J Cancer* 76, 1440-1447.

Brown, K. D., Lataxes, T. A., Shangary, S., Mannino, J. L., Giardina, J. F., Chen, J., and Baskaran, R. (2000). Ionizing radiation exposure results in up-regulation of Ku70 via a p53/ataxia-telangiectasia-mutated protein-dependent mechanism. *J Biol Chem* 275, 6651-6656.

Références bibliographiques

- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Bryans, M., Valenzano, M. C., and Stamato, T. D. (1999). Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: evidence for stabilization by XRCC4. *Mutat Res* 433, 53-58.
- Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M. C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J. L., Hufnagel, M., le Deist, F., *et al.* (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124, 287-299.
- Budman, J., and Chu, G. (2005). Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *Embo J* 24, 849-860.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276, 42462-42467.
- Burma, S., and Chen, D. J. (2004). Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 3, 909-918.
- Buterin, T., Meyer, C., Giese, B., and Naegeli, H. (2005). DNA quality control by conformational readout on the undamaged strand of the double helix. *Chem Biol* 12, 913-922.
- Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M., and Hoppe-Seyler, F. (2003). siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 22, 5938-5945.

C

- Callebaut, I., Malivert, L., Fischer, A., Mornon, J. P., Revy, P., and de Villartay, J. P. (2006). Cernunnos interacts with the XRCC4 x DNA-ligase IV complex and is homologous to the yeast nonhomologous end-joining factor Nej1. *J Biol Chem* 281, 13857-13860.
- Calsou, P., Frit, P., Humbert, O., Muller, C., Chen, D. J., and Salles, B. (1999). The DNA-dependent protein kinase catalytic activity regulates DNA end processing by means of Ku entry into DNA. *J Biol Chem* 274, 7848-7856.
- Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., and Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9742-9747.
- Capp, J. P., Boudsocq, F., Bertrand, P., Laroche-Clary, A., Pourquier, P., Lopez, B. S., Cazaux, C., Hoffmann, J. S., and Canitrot, Y. (2006). The DNA polymerase lambda is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 34, 2998-3007.
- Chalk, A. M., Warfinge, R. E., Georgii-Hemming, P., and Sonnhammer, E. L. (2005). siRNADB: a database of siRNA sequences. *Nucleic Acids Res* 33, D131-134.
- Chan, D. W., Chen, B. P., Prithivirajasingh, S., Kurimasa, A., Story, M. D., Qin, J., and Chen, D. J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev* 16, 2333-2338.
- Chan, D. W., Ye, R., Veillette, C. J., and Lees-Miller, S. P. (1999). DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer. *Biochemistry* 38, 1819-1828.
- Chappell, C., Hanakahi, L. A., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M., and West, S. C. (2002). Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *Embo J* 21, 2827-2832.
- Chen, B. P., Chan, D. W., Kobayashi, J., Burma, S., Asaithamby, A., Morotomi-Yano, K., Botvinick, E., Qin, J., and Chen, D. J. (2005). Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 280, 14709-14715.
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., and Tomkinson, A. E. (2001a). Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol Cell* 8, 1105-1115.
- Chen, S., Inamdar, K. V., Pfeiffer, P., Feldmann, E., Hannah, M. F., Yu, Y., Lee, J. W., Zhou, T., Lees-Miller, S. P., and Povirk, L. F. (2001b). Accurate in vitro end joining of a DNA double strand break with partially cohesive 3'-overhangs and 3'-phosphoglycolate termini: effect of Ku on repair fidelity. *J Biol Chem* 276, 24323-24330.
- Chen, Z., Xu, X. S., Yang, J., and Wang, G. (2003). Defining the function of XPC protein in psoralen and cisplatin-mediated DNA repair and mutagenesis. *Carcinogenesis* 24, 1111-1121.

Références bibliographiques

- Chiba, N., and Parvin, J. D. (2001). Redistribution of BRCA1 among four different protein complexes following replication blockage. *J Biol Chem* 276, 38549-38554.
- Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R. E., Hoeijmakers, J. H., and Vermeulen, W. (2000). ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol Cell Biol* 20, 7643-7653.
- Cleaver, J. E. (2005). Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* 5, 564-573.
- Cogoni, C., and Macino, G. (1997). Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10233-10238.
- Collis, S. J., DeWeese, T. L., Jeggo, P. A., and Parker, A. R. (2005). The life and death of DNA-PK. *Oncogene* 24, 949-961.
- Colton, S. L., Xu, X. S., Wang, Y. A., and 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.
- Costa, R. M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., Carvalho, H., and Menck, C. F. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85, 1083-1099.
- Couedel, C., Mills, K. D., Barchi, M., Shen, L., Olshen, A., Johnson, R. D., Nussenzweig, A., Essers, J., Kanaar, R., Li, G. C., *et al.* (2004). Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells. *Genes Dev* 18, 1293-1304.
- Cui, X., Yu, Y., Gupta, S., Cho, Y. M., Lees-Miller, S. P., and Meek, K. (2005). Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell Biol* 25, 10842-10852.

D

- Daley, J. M., Palmbo, P. L., Wu, D., and Wilson, T. E. (2005). Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* 39, 431-451.
- Dasika, G. K., Lin, S. C., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A., and Lee, E. Y. (1999). DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18, 7883-7899.
- Datta, A., Bagchi, S., Nag, A., Shiyonov, P., Adami, G. R., Yoon, T., and Raychaudhuri, P. (2001). The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. *Mutat Res* 486, 89-97.
- Daya-Grosjean, L., and Sarasin, A. (2005). The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutat Res* 571, 43-56.
- Daza, P., Reichenberger, S., Gottlich, B., Haggmann, M., Feldmann, E., and Pfeiffer, P. (1996). Mechanisms of nonhomologous DNA end-joining in frogs, mice and men. *Biol Chem* 377, 775-786.
- de Boer, J., and Hoeijmakers, J. H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453-460.
- DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., and Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo J* 21, 3192-3200.
- Deriano, L., Guipaud, O., Merle-Beral, H., Binet, J. L., Ricoul, M., Potocki-Veronese, G., Favaudon, V., Maciorowski, Z., Muller, C., Salles, B., *et al.* (2005). Human chronic lymphocytic leukemia B cells can escape DNA damage-induced apoptosis through the nonhomologous end-joining DNA repair pathway. *Blood* 105, 4776-4783.
- DiBiase, S. J., Zeng, Z. C., Chen, R., Hyslop, T., Curran, W. J., Jr., and Iliakis, G. (2000). DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res* 60, 1245-1253.
- Diggle, C. P., Bentley, J., and Kiltie, A. E. (2003). Development of a rapid, small-scale DNA repair assay for use on clinical samples. *Nucleic Acids Res* 31, e83.

Références bibliographiques

Ding, Q., Reddy, Y. V., Wang, W., Woods, T., Douglas, P., Ramsden, D. A., Lees-Miller, S. P., and Meek, K. (2003). Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 23, 5836-5848.

Donahue, S. L., and Campbell, C. (2004). A Rad50-dependent pathway of DNA repair is deficient in Fanconi anemia fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 32, 3248-3257.

Douglas, P., Gupta, S., Morrice, N., Meek, K., and Lees-Miller, S. P. (2005). DNA-PK-dependent phosphorylation of Ku70/80 is not required for non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* 4, 1006-1018.

Douglas, P., Sapkota, G. P., Morrice, N., Yu, Y., Goodarzi, A. A., Merkle, D., Meek, K., Alessi, D. R., and Lees-Miller, S. P. (2002). Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Biochem J* 368, 243-251.

Drouet, J., Delteil, C., Lefrancois, J., Concannon, P., Salles, B., and Calsou, P. (2005). DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 280, 7060-7069.

E

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.

Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20, 6877-6888.

El-Mahdy, M. A., Zhu, Q., Wang, Q. E., Wani, G., Praetorius-Ibba, M., and Wani, A. A. (2006). Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC. *J Biol Chem* 281, 13404-13411.

Elmroth, K., Nygren, J., Martensson, S., Ismail, I. H., and Hammarsten, O. (2003). Cleavage of cellular DNA by calicheamicin gamma1. *DNA Repair (Amst)* 2, 363-374.

Emmert, S., Kobayashi, N., Khan, S. G., and Kraemer, K. H. (2000). The xeroderma pigmentosum group C gene leads to selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers rather than 6-4 photoproducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2151-2156.

Esteller, M., and Herman, J. G. (2004). Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 23, 1-8.

F

Falck, J., Coates, J., and Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605-611.

Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S., and Pfeiffer, P. (2000). DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res* 28, 2585-2596.

Finnie, N. J., Gottlieb, T. M., Blunt, T., Jeggo, P. A., and Jackson, S. P. (1995). DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 320-324.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Fitch, M. E., Nakajima, S., Yasui, A., and Ford, J. M. (2003). In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J Biol Chem* 278, 46906-46910.

Foster, R. E., Nnakwe, C., Woo, L., and Frank, K. M. (2006). Monoubiquitination of the nonhomologous end joining protein XRCC4. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 175-183.

Frank-Vaillant, M., and Marcand, S. (2002). Transient stability of DNA ends allows nonhomologous end joining to precede homologous recombination. *Mol Cell* 10, 1189-1199.

Friedberg, E. C. (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 22-33.

Références bibliographiques

G

- Garinis, G. A., Mitchell, J. R., Moorhouse, M. J., Hanada, K., de Waard, H., Vandeputte, D., Jans, J., Brand, K., Smid, M., van der Spek, P. J., *et al.* (2005). Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *Embo J* 24, 3952-3962.
- Giglia-Mari, G., Coin, F., Ranish, J. A., Hoogstraten, D., Theil, A., Wijgers, N., Jaspers, N. G., Raams, A., Argentini, M., van der Spek, P. J., *et al.* (2004). A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet* 36, 714-719.
- Gillet, L. C., and Scharer, O. D. (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev* 106, 253-276.
- Golub, E. I., Gupta, R. C., Haaf, T., Wold, M. S., and Radding, C. M. (1998). Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res* 26, 5388-5393.
- Gottlich, B., Reichenberger, S., Feldmann, E., and Pfeiffer, P. (1998). Rejoining of DNA double-strand breaks in vitro by single-strand annealing. *Eur J Biochem* 258, 387-395.
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631-640.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A. F., Tanaka, K., and Nakatani, Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* 113, 357-367.
- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., and Lopez, B. S. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol Cell* 14, 611-623.

H

- Haber, J. E. (1999). DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24, 271-275.
- Halicka, H. D., Huang, X., Traganos, F., King, M. A., Dai, W., and Darzynkiewicz, Z. (2005). Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cell Cycle* 4, 339-345.
- Hamer, G., Roepers-Gajadien, H. L., van Duyn-Goedhart, A., Gademan, I. S., Kal, H. B., van Buul, P. P., Ashley, T., and de Rooij, D. G. (2003). Function of DNA-protein kinase catalytic subunit during the early meiotic prophase without Ku70 and Ku86. *Biol Reprod* 68, 717-721.
- Han, J. O., Steen, S. B., and Roth, D. B. (1997). Ku86 is not required for protection of signal ends or for formation of nonstandard V(D)J recombination products. *Mol Cell Biol* 17, 2226-2234.
- Hanakahi, L. A., Bartlet-Jones, M., Chappell, C., Pappin, D., and West, S. C. (2000). Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair. *Cell* 102, 721-729.
- Hanakahi, L. A., and West, S. C. (2002). Specific interaction of IP6 with human Ku70/80, the DNA-binding subunit of DNA-PK. *Embo J* 21, 2038-2044.
- He, L., and Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5, 522-531.
- Hefferin, M. L., and Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* 4, 639-648.
- Helleday, T. (2003). Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res* 532, 103-115.
- Henning, K. A., Li, L., Iyer, N., McDaniel, L. D., Reagan, M. S., Legerski, R., Schultz, R. A., Stefanini, M., Lehmann, A. R., Mayne, L. V., and Friedberg, E. C. (1995). The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell* 82, 555-564.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Hong, G., and Kreuzer, K. N. (2003). Endonuclease cleavage of blocked replication forks: An indirect pathway of DNA damage from antitumor drug-topoisomerase complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5046-5051.

Références bibliographiques

Hoogervorst, E. M., van Oostrom, C. T., Beems, R. B., van Benthem, J., van den Berg, J., van Kreijl, C. F., Vos, J. G., de Vries, A., and van Steeg, H. (2005). 2-AAF-induced tumor development in nucleotide excision repair-deficient mice is associated with a defect in global genome repair but not with transcription coupled repair. *DNA Repair (Amst)* 4, 3-9.

Hoppe, B. S., Jensen, R. B., and Kirchgessner, C. U. (2000). Complementation of the radiosensitive M059J cell line. *Radiat Res* 153, 125-130.

Hsu, H. L., Yannone, S. M., and Chen, D. J. (2002). Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA Repair (Amst)* 1, 225-235.

Huang, J., and Dynan, W. S. (2002). Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res* 30, 667-674.

Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C., and Chu, G. (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, 424-428.

I, J

Itin, P. H., Sarasin, A., and Pittelkow, M. R. (2001). Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. *J Am Acad Dermatol* 44, 891-920; quiz 921-894.

Jacob, S., Aguado, M., Fallik, D., and Praz, F. (2001). The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells. *Cancer Res* 61, 6555-6562.

Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C., Lukas, J., and Jackson, S. P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8, 37-45.

Jeggo, P. A., and Lobrich, M. (2005). Artemis links ATM to double strand break rejoining. *Cell Cycle* 4, 359-362.

Jurica, M. S., and Moore, M. J. (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell* 12, 5-14.

K

Kabotyanski, E. B., Gomelsky, L., Han, J. O., Stamato, T. D., and Roth, D. B. (1998). Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res* 26, 5333-5342.

Kannouche, P., and Angulo, J. F. (1999). Overexpression of kin17 protein disrupts nuclear morphology and inhibits the growth of mammalian cells. *J Cell Sci* 112, 3215-3224.

Kannouche, P., Broughton, B. C., Volker, M., Hanaoka, F., Mullenders, L. H., and Lehmann, A. R. (2001). Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev* 15, 158-172.

Kannouche, P., Mauffrey, P., Pinon-lataillade, G., Mattei, M. G., Sarasin, A., Daya-Grosjean, L., and Angulo, J. F. (2000). Molecular cloning and characterization of the human KIN17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans. *Carcinogenesis* 21, 1701-1710.

Kannouche, P., Pinon-Lataillade, G., Mauffrey, P., Faucher, C., Biard, D. S., and Angulo, J. F. (1997). Overexpression of kin17 protein forms intranuclear foci in mammalian cells. *Biochimie* 79, 599-606.

Kannouche, P., Pinon-Lataillade, G., Tissier, A., Chevalier-Lagente, O., Sarasin, A., Mezzina, M., and Angulo, J. F. (1998). The nuclear concentration of kin17, a mouse protein which binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation. *Carcinogenesis* 19, 781-789.

Kantidze, O. L., Iarovaia, O. V., and Razin, S. V. (2006). Assembly of nuclear matrix-bound protein complexes involved in non-homologous end joining is induced by inhibition of DNA topoisomerase II. *J Cell Physiol* 207, 660-667.

Karmakar, P., Snowden, C. M., Ramsden, D. A., and Bohr, V. A. (2002). Ku heterodimer binds to both ends of the Werner protein and functional interaction occurs at the Werner N-terminus. *Nucleic Acids Res* 30, 3583-3591.

Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.

Références bibliographiques

- Kim, J. S., Krasieva, T. B., Kurumizaka, H., Chen, D. J., Taylor, A. M., and Yokomori, K. (2005). Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J Cell Biol* 170, 341-347.
- Koch, C. A., Agyei, R., Galicia, S., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Starostine, A., Weinfeld, M., and Durocher, D. (2004). Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *Embo J* 23, 3874-3885.
- Koh, K. H., Kang, H. J., Li, L. S., Kim, N. G., You, K. T., Yang, E., Kim, H., Kim, H. J., Yun, C. O., and Kim, K. S. (2005). Impaired nonhomologous end-joining in mismatch repair-deficient colon carcinomas. *Lab Invest* 85, 1130-1138.
- Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A. K., Lauder, S. D., and Rehrauer, W. M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 58, 401-465.
- Kraemer, K. H., Lee, M. M., and Scotto, J. (1987). Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol* 123, 241-250.
- Kuhne, C., Tjornhammar, M. L., Pongor, S., Banks, L., and Simoncsits, A. (2003). Repair of a minimal DNA double-strand break by NHEJ requires DNA-PKcs and is controlled by the ATM/ATR checkpoint. *Nucleic Acids Res* 31, 7227-7237.
- Kuhne, M., Riballo, E., Rief, N., Rothkamm, K., Jeggo, P. A., and Lobrich, M. (2004). A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res* 64, 500-508.
- Kulaksiz, G., Reardon, J. T., and Sancar, A. (2005). Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DBP2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties. *Mol Cell Biol* 25, 9784-9792.
- Kurimasa, A., Kumano, S., Boubnov, N. V., Story, M. D., Tung, C. S., Peterson, S. R., and Chen, D. J. (1999). Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. *Mol Cell Biol* 19, 3877-3884.
- Kysela, B., Doherty, A. J., Chovanec, M., Stiff, T., Ameer-Beg, S. M., Vojnovic, B., Girard, P. M., and Jeggo, P. A. (2003). Ku stimulation of DNA ligase IV-dependent ligation requires inward movement along the DNA molecule. *J Biol Chem* 278, 22466-22474.

L

- Labhart, P. (1999). Nonhomologous DNA end joining in cell-free systems. *Eur J Biochem* 265, 849-861.
- Laine, J. P., and Egly, J. M. (2006). Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II. *Embo J* 25, 387-397.
- Laposa, R. R., Feeney, L., and Cleaver, J. E. (2003). Recapitulation of the cellular xeroderma pigmentosum-variant phenotypes using short interfering RNA for DNA polymerase H. *Cancer Res* 63, 3909-3912.
- le Maire, A., Schiltz, M., Braud, S., Gondry, M., Charbonnier, J. B., Zinn-Justin, S., and Stura, E. (2006). Crystallization and halide phasing of the C-terminal domain of human KIN17. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62, 245-248.
- Le Rhun, Y., Duthu, A., Ehrhart, J. C., Michiels, F., May, E., and May, P. (1994). Directional selection associated with clonal expansion of p53 mutant cells during neoplastic development of carcinogen-treated rat embryo lung epithelial cells. *Oncogene* 9, 263-271.
- Leber, R., Wise, T. W., Mizuta, R., and Meek, K. (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 273, 1794-1801.
- Lee, J. W., Blanco, L., Zhou, T., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T. A., Wang, Z., and Povirk, L. F. (2004). Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem* 279, 805-811.
- Lee, J. W., Yannone, S. M., Chen, D. J., and Povirk, L. F. (2003). Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in vitro. *Cancer Res* 63, 22-24.
- Lee, K. J., Huang, J., Takeda, Y., and Dynan, W. S. (2000). DNA ligase IV and XRCC4 form a stable mixed tetramer that functions synergistically with other repair factors in a cell-free end-joining system. *J Biol Chem* 275, 34787-34796.

Références bibliographiques

- Lehmann, A. R. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 85, 1101-1111.
- Lehmann, A. R. (2005). Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS Lett* 579, 873-876.
- Li, B., and Comai, L. (2002). Displacement of DNA-PKcs from DNA ends by the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 30, 3653-3661.
- Li, G., Nelsen, C., and Hendrickson, E. A. (2002). Ku86 is essential in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 832-837.
- Liang, F., and Jasin, M. (1996). Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J Biol Chem* 271, 14405-14411.
- Liang, L., Deng, L., Chen, Y., Li, G. C., Shao, C., and Tischfield, J. A. (2005). Modulation of DNA end joining by nuclear proteins. *J Biol Chem* 280, 31442-31449.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 712-720.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K. (2004). The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)* 3, 817-826.
- Limoli, C. L., Giedzinski, E., and Cleaver, J. E. (2005). Alternative recombination pathways in UV-irradiated XP variant cells. *Oncogene* 24, 3708-3714.
- Lin, Q., Clark, A. B., McCulloch, S. D., Yuan, T., Bronson, R. T., Kunkel, T. A., and Kucherlapati, R. (2006). Increased susceptibility to UV-induced skin carcinogenesis in polymerase eta-deficient mice. *Cancer Res* 66, 87-94.
- Lou, Z., Chen, B. P., Asaithamby, A., Minter-Dykhouse, K., Chen, D. J., and Chen, J. (2004). MDC1 regulates DNA-PK autophosphorylation in response to DNA damage. *J Biol Chem* 279, 46359-46362.
- Lundin, C., Erixon, K., Arnaudeau, C., Schultz, N., Jenssen, D., Meuth, M., and Helleday, T. (2002). Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 22, 5869-5878.
- Lundin, C., Schultz, N., Arnaudeau, C., Mohindra, A., Hansen, L. T., and Helleday, T. (2003). RAD51 is involved in repair of damage associated with DNA replication in mammalian cells. *J Mol Biol* 328, 521-535.
-
- M
-
- Ma, Y., Lu, H., Schwarz, K., and Lieber, M. R. (2005). Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model. *Cell Cycle* 4, 1193-1200.
- Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M. F., Shimazaki, N., Koiwai, O., Hsieh, C. L., Schwarz, K., and Lieber, M. R. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell* 16, 701-713.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781-794.
- MacPhail, S. H., and Olive, P. L. (2001). RPA foci are associated with cell death after irradiation. *Radiat Res* 155, 672-679.
- Mahajan, K. N., Gangi-Peterson, L., Sorscher, D. H., Wang, J., Gathy, K. N., Mahajan, N. P., Reeves, W. H., and Mitchell, B. S. (1999). Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13926-13931.
- Mahajan, K. N., Nick McElhinny, S. A., Mitchell, B. S., and Ramsden, D. A. (2002). Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 22, 5194-5202.
- Makarov, E. M., Makarova, O. V., Urlaub, H., Gentzel, M., Will, C. L., Wilm, M., and Luhrmann, R. (2002). Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* 298, 2205-2208.

Références bibliographiques

- Makarova, O. V., Makarov, E. M., Urlaub, H., Will, C. L., Gentzel, M., Wilm, M., and Luhrmann, R. (2004). A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *Embo J* 23, 2381-2391.
- Manders, E. M., Stap, J., Brakenhoff, G. J., van Driel, R., and Aten, J. A. (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci* 103, 857-862.
- Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Pilot, T., Coppey-Moisan, M., and Nicolas, J. C. (1999). Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol* 73, 4385-4392.
- Masson, C., Menea, F., Pinon-Lataillade, G., Frobert, Y., Chevillard, S., Radicella, J. P., Sarasin, A., and Angulo, J. F. (2003). Global genome repair is required to activate KIN17, a UVC-responsive gene involved in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 616-621.
- Masson, C., Menea, F., Pinon-Lataillade, G., Frobert, Y., Radicella, J. P., and Angulo, J. F. (2001). Identification of KIN (KIN17), a human gene encoding a nuclear DNA-binding protein, as a novel component of the TP53-independent response to ionizing radiation. *Radiat Res* 156, 535-544.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2000). Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase ϵ . *Embo J* 19, 3100-3109.
- Matsumoto, Y., Suzuki, N., Namba, N., Umeda, N., Ma, X. J., Morita, A., Tomita, M., Enomoto, A., Serizawa, S., Hirano, K., *et al.* (2000). Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS Lett* 478, 67-71.
- Mazin, A., Milot, E., Devoret, R., and Chartrand, P. (1994a). Kin17, a mouse nuclear protein, binds to bent DNA fragments that are found at illegitimate recombination junctions in mammalian cells. *Mol Gen Genet* 244, 435-438.
- Mazin, A., Timchenko, T., Mènisier-de Murcia, J., Schreiber, V., Angulo, J. F., de Murcia, G., and Devoret, R. (1994b). Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. *Nucleic Acids Res* 22, 4335-4341.
- McHugh, P. J., Spanswick, V. J., and Hartley, J. A. (2001). Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol* 2, 483-490.
- McKay, B. C., Becerril, C., and Ljungman, M. (2001). P53 plays a protective role against UV- and cisplatin-induced apoptosis in transcription-coupled repair proficient fibroblasts. *Oncogene* 20, 6805-6808.
- Meek, K., Gupta, S., Ramsden, D. A., and Lees-Miller, S. P. (2004). The DNA-dependent protein kinase: the director at the end. *Immunol Rev* 200, 132-141.
- Mellon, I., Spivak, G., and Hanawalt, P. C. (1987). Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* 51, 241-249.
- Merel, P., Prieur, A., Pfeiffer, P., and Delattre, O. (2002). Absence of major defects in non-homologous DNA end joining in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 21, 5654-5659.
- Merkle, D., Douglas, P., Moorhead, G. B., Leonenko, Z., Yu, Y., Cramb, D., Bazett-Jones, D. P., and Lees-Miller, S. P. (2002). The DNA-dependent protein kinase interacts with DNA to form a protein-DNA complex that is disrupted by phosphorylation. *Biochemistry* 41, 12706-12714.
- Miccoli, L., Biard, D. S., Creminon, C., and Angulo, J. F. (2002). Human kin17 protein directly interacts with the simian virus 40 large T antigen and inhibits DNA replication. *Cancer Res* 62, 5425-5435.
- Miccoli, L., Biard, D. S., Frouin, I., Harper, F., Maga, G., and Angulo, J. F. (2003). Selective interactions of human kin17 and RPA proteins with chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. *Nucleic Acids Res* 31, 4162-4175.
- Miccoli, L., Frouin, I., Novac, O., Di Paola, D., Harper, F., Zannis-Hadjopoulos, M., Maga, G., Biard, D. S., and Angulo, J. F. (2005). The human stress-activated protein kin17 belongs to the multiprotein DNA replication complex and associates in vivo with mammalian replication origins. *Mol Cell Biol* 25, 3814-3830.
- Modesti, M., Junop, M. S., Ghirlando, R., van de Rakt, M., Gellert, M., Yang, W., and Kanaar, R. (2003). Tetramerization and DNA ligase IV interaction of the DNA double-strand break repair protein XRCC4 are mutually exclusive. *J Mol Biol* 334, 215-228.

Références bibliographiques

- Molinier, J., Ramos, C., Fritsch, O., and Hohn, B. (2004). CENTRIN2 modulates homologous recombination and nucleotide excision repair in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 1633-1643.
- Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., *et al.* (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105, 177-186.
- Motycka, T. A., Bessho, T., Post, S. M., Sung, P., and Tomkinson, A. E. (2004). Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. *J Biol Chem* 279, 13634-13639.
- Muller, C., Paupert, J., Monferran, S., and Salles, B. (2005). The double life of the Ku protein: facing the DNA breaks and the extracellular environment. *Cell Cycle* 4, 438-441.

N

- Nahari, D., McDaniel, L. D., Task, L. B., Daniel, R. L., Velasco-Miguel, S., and Friedberg, E. C. (2004). Mutations in the Trp53 gene of UV-irradiated Xpc mutant mice suggest a novel Xpc-dependent DNA repair process. *DNA Repair (Amst)* 3, 379-386.
- Nance, M. A., and Berry, S. A. (1992). Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet* 42, 68-84.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Newport, J., and Yan, H. (1996). Organization of DNA into foci during replication. *Curr Opin Cell Biol* 8, 365-368.
- Ng, J. M., Vermeulen, W., van der Horst, G. T., Bergink, S., Sugawara, K., Vrieling, H., and Hoeijmakers, J. H. (2003). A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev* 17, 1630-1645.
- Nick McElhinny, S. A., Havener, J. M., Garcia-Diaz, M., Juarez, R., Bebenek, K., Kee, B. L., Blanco, L., Kunkel, T. A., and Ramsden, D. A. (2005). A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell* 19, 357-366.
- Nick McElhinny, S. A., Snowden, C. M., McCarville, J., and Ramsden, D. A. (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* 20, 2996-3003.
- Niedernhofer, L. J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A. F., de Wit, J., Jaspers, N. G., Beverloo, H. B., Hoeijmakers, J. H., and Kanaar, R. (2004). The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 24, 5776-5787.
- Nishi, R., Okuda, Y., Watanabe, E., Mori, T., Iwai, S., Masutani, C., Sugawara, K., and Hanaoka, F. (2005). Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol Cell Biol* 25, 5664-5674.
- Noel, G., Giocanti, N., Fernet, M., Megnin-Chanet, F., and Favaudon, V. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is not involved in DNA double-strand break recovery. *BMC Cell Biol* 4, 7.
- Nunez, M. I., Villalobos, M., Olea, N., Valenzuela, M. T., Pedraza, V., McMillan, T. J., and Ruiz de Almodovar, J. M. (1995). Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumour cells. *Br J Cancer* 71, 311-316.

O

- Odersky, A., Panyutin, I. V., Panyutin, I. G., Schunck, C., Feldmann, E., Goedecke, W., Neumann, R. D., Obe, G., and Pfeiffer, P. (2002). Repair of sequence-specific 125I-induced double-strand breaks by nonhomologous DNA end joining in mammalian cell-free extracts. *J Biol Chem* 277, 11756-11764.
- O'Driscoll, M., Gennery, A. R., Seidel, J., Concannon, P., and Jeggo, P. A. (2004). An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair (Amst)* 3, 1227-1235.
- O'Driscoll, M., and Jeggo, P. A. (2006). The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7, 45-54.
- Ohyama, T. (2001). Intrinsic DNA bends: an organizer of local chromatin structure for transcription. *Bioessays* 23, 708-715.

Références bibliographiques

Olson, A., Sheth, N., Lee, J. S., Hannon, G., and Sachidanandam, R. (2006). RNAi Codex: a portal/database for short-hairpin RNA (shRNA) gene-silencing constructs. *Nucleic Acids Res* 34, D153-157.

Oshima, J., Huang, S., Pae, C., Campisi, J., and Schiestl, R. H. (2002). Lack of WRN results in extensive deletion at nonhomologous joining ends. *Cancer Res* 62, 547-551.

P, Q

Paddison, P. J., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. (2002). Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1443-1448.

Park, C. J., and Choi, B. S. (2006). The protein shuffle. Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway. *Febs J* 273, 1600-1608.

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

Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10, 886-895.

Pawlik, T. M., and Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59, 928-942.

Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C., and Tuschl, T. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734-736.

Pfeifer, G. P., You, Y. H., and Besaratinia, A. (2005). Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* 571, 19-31.

Pfeiffer, P., Feldmann, E., Odersky, A., Kuhfittig-Kulle, S., and Goedecke, W. (2005). Analysis of DNA double-strand break repair by nonhomologous end joining in cell-free extracts from mammalian cells. *Methods Mol Biol* 291, 351-371.

Pfeiffer, P., Thode, S., Hancke, J., and Vielmetter, W. (1994). Mechanisms of overlap formation in nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell Biol* 14, 888-895.

Pinon-Lataillade, G., Masson, C., Bernardino-Sgherri, J., Henriot, V., Mauffrey, P., Frobert, Y., Araneda, S., and Angulo, J. F. (2004). KIN17 encodes an RNA-binding protein and is expressed during mouse spermatogenesis. *J Cell Sci* 117, 3691-3702.

Pospiech, H., Rytönen, A. K., and Syvaöja, J. E. (2001). The role of DNA polymerase activity in human non-homologous end joining. *Nucleic Acids Res* 29, 3277-3288.

R

Raghavan, S. C., and Raman, M. J. (2004). Nonhomologous end joining of complementary and noncomplementary DNA termini in mouse testicular extracts. *DNA Repair (Amst)* 3, 1297-1310.

Rapp, A., and Greulich, K. O. (2004). After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *J Cell Sci* 117, 4935-4945.

Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A. I., and Mann, M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* 12, 1231-1245.

Raymond, A. C., Staker, B. L., and Burgin, A. B., Jr. (2005). Substrate specificity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp1). *J Biol Chem* 280, 22029-22035.

Reardon, J. T., and Sancar, A. (2006). Repair of DNA-polypeptide crosslinks by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4056-4061.

Ren, K., and de Ortiz, S. P. (2002). Non-homologous DNA end joining in the mature rat brain. *J Neurochem* 80, 949-959.

Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G. C., Recio, M. J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., *et al.* (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell* 16, 715-724.

Références bibliographiques

- Richardson, C., and Jasin, M. (2000). Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 20, 9068-9075.
- Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J. M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J* 22, 5293-5303.
- Riou, L., Zeng, L., Chevallier-Lagente, O., Sary, A., Nikaïdo, O., Taieb, A., Weeda, G., Mezzina, M., and Sarasin, A. (1999). The relative expression of mutated XPB genes results in xeroderma pigmentosum/Cockayne's syndrome or trichothiodystrophy cellular phenotypes. *Hum Mol Genet* 8, 1125-1133.
- Ristic, D., Modesti, M., Kanaar, R., and Wyman, C. (2003). Rad52 and Ku bind to different DNA structures produced early in double-strand break repair. *Nucleic Acids Res* 31, 5229-5237.
- Ritzi, M., Baack, M., Musahl, C., Romanowski, P., Laskey, R. A., and Knippers, R. (1998). Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin. *J Biol Chem* 273, 24543-24549.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., and Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.
- Rooney, S., Alt, F. W., Lombard, D., Whitlow, S., Eckersdorff, M., Fleming, J., Fugmann, S., Ferguson, D. O., Schatz, D. G., and Sekiguchi, J. (2003). Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J Exp Med* 197, 553-565.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H., and Lobrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23, 5706-5715.
- Ruiz, M. T., Matheos, D., Price, G. B., and Zannis-Hadjopoulos, M. (1999). OBA/Ku86: DNA binding specificity and involvement in mammalian DNA replication. *Mol Biol Cell* 10, 567-580.

S

- Sabourin, M., Nitiss, J. L., Nitiss, K. C., Tatebayashi, K., Ikeda, H., and Osheroff, N. (2003). Yeast recombination pathways triggered by topoisomerase II-mediated DNA breaks. *Nucleic Acids Res* 31, 4373-4384.
- Sancar, A. (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* 103, 2203-2237.
- Schlacher, K., Pham, P., Cox, M. M., and Goodman, M. F. (2006). Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation. *Chem Rev* 106, 406-419.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Scully, R., and Xie, A. (2005). In my end is my beginning: control of end resection and DSB repair pathway 'choice' by cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 24, 2871-2876.
- Secretan, M. B., Scuric, Z., Oshima, J., Bishop, A. J., Howlett, N. G., Yau, D., and Schiestl, R. H. (2004). Effect of Ku86 and DNA-PKcs deficiency on non-homologous end-joining and homologous recombination using a transient transfection assay. *Mutat Res* 554, 351-364.
- Shimizu, Y., Iwai, S., Hanaoka, F., and Sugawara, K. (2003). Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. *Embo J* 22, 164-173.
- Sibanda, B. L., Critchlow, S. E., Begun, J., Pei, X. Y., Jackson, S. P., Blundell, T. L., and Pellegrini, L. (2001). Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex. *Nat Struct Biol* 8, 1015-1019.
- Siino, J. S., Nazarov, I. B., Zalenskaya, I. A., Yau, P. M., Bradbury, E. M., and Tomilin, N. V. (2002). End-joining of reconstituted histone H2AX-containing chromatin in vitro by soluble nuclear proteins from human cells. *FEBS Lett* 527, 105-108.
- Smith, J., Baldeyron, C., De Oliveira, I., Sala-Trepat, M., and Papadopoulo, D. (2001). The influence of DNA double-strand break structure on end-joining in human cells. *Nucleic Acids Res* 29, 4783-4792.
- Smith, J., Riballo, E., Kysela, B., Baldeyron, C., Manolis, K., Masson, C., Lieber, M. R., Papadopoulo, D., and Jeggo, P. (2003). Impact of DNA ligase IV on the fidelity of end joining in human cells. *Nucleic Acids Res* 31, 2157-2167.

Références bibliographiques

- Smith, J. A., Waldman, B. C., and Waldman, A. S. (2005). A role for DNA mismatch repair protein Msh2 in error-prone double-strand-break repair in mammalian chromosomes. *Genetics* 170, 355-363.
- Squires, S., Coates, J. A., Goldberg, M., Toji, L. H., Jackson, S. P., Clarke, D. J., and Johnson, R. T. (2004). p53 prevents the accumulation of double-strand DNA breaks at stalled-replication forks induced by UV in human cells. *Cell Cycle* 3, 1543-1557.
- Steiner, T., Kaiser, J. T., Marinkovic, S., Huber, R., and Wahl, M. C. (2002). Crystal structures of transcription factor NusG in light of its nucleic acid- and protein-binding activities. *EMBO J* 21, 4641-4651.
- Stewart, G. S., Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M., and Elledge, S. J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961-966.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., and Jeggo, P. A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 64, 2390-2396.
- Strick, R., Strissel, P. L., Gavrilov, K., and Levi-Setti, R. (2001). Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *J Cell Biol* 155, 899-910.
- Sugasawa, K., Ng, J. M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P. J., Eker, A. P., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 2, 223-232.
- Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2001). A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev* 15, 507-521.
- Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., and Hanaoka, F. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121, 387-400.
- Sugasawa, K., Shimizu, Y., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2002). A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)* 1, 95-107.
- Svejstrup, J. Q., Vichi, P., and Egly, J. M. (1996). The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH. *Trends Biochem Sci* 21, 346-350.

T, U

- Tapias, A., Auriol, J., Forget, D., Enzlin, J. H., Scharer, O. D., Coin, F., Coulombe, B., and Egly, J. M. (2004). Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. *J Biol Chem* 279, 19074-19083.
- Timchenko, T., Bailone, A., and Devoret, R. (1996). Btdc, a mouse protein that binds to curved DNA, can substitute in *Escherichia coli* for H-NS, a bacterial nucleoid protein. *EMBO J* 15, 3986-3992.
- Tissier, A., Kannouche, P., Biard, D. S., Timchenko, T., Mazin, A., Araneda, S., Allemand, I., Mauffrey, P., Frelat, G., and Angulo, J. F. (1995). The mouse Kin-17 gene codes for a new protein involved in DNA transactions and is akin to the bacterial RecA protein. *Biochimie* 77, 854-860.
- Troelstra, C., van Gool, A., de Wit, J., Vermeulen, W., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1992). ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 71, 939-953.
- Tsuchida, R., Yamada, T., Takagi, M., Shimada, A., Ishioka, C., Katsuki, Y., Igarashi, T., Chessa, L., Delia, D., Teraoka, H., and Mizutani, S. (2002). Detection of ATM gene mutation in human glioma cell line M059J by a rapid frameshift/stop codon assay in yeast. *Radiat Res* 158, 195-201.
- Udayakumar, D., Bladen, C. L., Hudson, F. Z., and Dynan, W. S. (2003). Distinct pathways of nonhomologous end joining that are differentially regulated by DNA-dependent protein kinase-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 278, 41631-41635.
- Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R., and Saigo, K. (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 32, 936-948.

V

- Valerie, K., and Povirk, L. F. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22, 5792-5812.

Références bibliographiques

van der Krol, A. R., Mur, L. A., de Lange, P., Mol, J. N., and Stuitje, A. R. (1990). Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Mol Biol* 14, 457-466.

van Heemst, D., Brugmans, L., Verkaik, N. S., and van Gent, D. C. (2004). End-joining of blunt DNA double-strand breaks in mammalian fibroblasts is precise and requires DNA-PK and XRCC4. *DNA Repair (Amst)* 3, 43-50.

van Oosten, M., Rebel, H., Friedberg, E. C., van Steeg, H., van der Horst, G. T., van Kranen, H. J., Westerman, A., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H., and de Gruijl, F. R. (2000). Differential role of transcription-coupled repair in UVB-induced G2 arrest and apoptosis in mouse epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11268-11273.

van Oosterwijk, M. F., Filon, R., de Groot, A. J., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. (1998). Lack of transcription-coupled repair of acetylaminofluorene DNA adducts in human fibroblasts contrasts their efficient inhibition of transcription. *J Biol Chem* 273, 13599-13604.

van Oosterwijk, M. F., Versteeg, A., Filon, R., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. (1996). The sensitivity of Cockayne's syndrome cells to DNA-damaging agents is not due to defective transcription-coupled repair of active genes. *Mol Cell Biol* 16, 4436-4444.

Vilenchik, M. M., and Knudson, A. G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12871-12876.

Volker, M., Mone, M. J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., van Driel, R., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* 8, 213-224.

W

Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P. B., and Elledge, S. J. (2002). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298, 1435-1438.

Wang, G., Dombkowski, A., Chuang, L., and Xu, X. X. (2004a). The involvement of XPC protein in the cisplatin DNA damaging treatment-mediated cellular response. *Cell Res* 14, 303-314.

Wang, H., Perrault, A. R., Takeda, Y., Qin, W., and Iliakis, G. (2003). Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res* 31, 5377-5388.

Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., and Iliakis, G. (2005a). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res* 65, 4020-4030.

Wang, H. C., Chou, W. C., Shieh, S. Y., and Shen, C. Y. (2006). Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res* 66, 1391-1400.

Wang, Q. E., Zhu, Q., Wani, G., El-Mahdy, M. A., Li, J., and Wani, A. A. (2005b). DNA repair factor XPC is modified by SUMO-1 and ubiquitin following UV irradiation. *Nucleic Acids Res* 33, 4023-4034.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., and Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14, 927-939.

Wang, Y. G., Nnakwe, C., Lane, W. S., Modesti, M., and Frank, K. M. (2004b). Phosphorylation and regulation of DNA ligase IV stability by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 279, 37282-37290.

Wechsler, T., Chen, B. P., Harper, R., Morotomi-Yano, K., Huang, B. C., Meek, K., Cleaver, J. E., Chen, D. J., and Wabl, M. (2004). DNA-PKcs function regulated specifically by protein phosphatase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1247-1252.

Weterings, E., and van Gent, D. C. (2004). The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synopsis. *DNA Repair (Amst)* 3, 1425-1435.

Weterings, E., Verkaik, N. S., Bruggenwirth, H. T., Hoeijmakers, J. H., and van Gent, D. C. (2003). The role of DNA dependent protein kinase in synopsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res* 31, 7238-7246.

Wijnhoven, S. W., Kool, H. J., Mullenders, L. H., van Zeeland, A. A., Friedberg, E. C., van der Horst, G. T., van Steeg, H., and Vrieling, H. (2000). Age-dependent spontaneous mutagenesis in Xpc mice defective in nucleotide excision repair. *Oncogene* 19, 5034-5037.

Willmore, E., de Caux, S., Sunter, N. J., Tilby, M. J., Jackson, G. H., Austin, C. A., and Durkacz, B. W. (2004). A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* 103, 4659-4665.

Références bibliographiques

Wittschieben, B. O., Iwai, S., and Wood, R. D. (2005). DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/aprimidinic sites, and compound lesions in DNA. *J Biol Chem* 280, 39982-39989.

Wu, X., Wilson, T. E., and Lieber, M. R. (1999). A role for FEN-1 in nonhomologous DNA end joining: the order of strand annealing and nucleolytic processing events. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1303-1308.

X, Y, Z

Yang, A., Miron, S., Mouawad, L., Duchambon, P., Blouquit, Y., and Craescu, C. T. (2006). Flexibility and plasticity of human centrin 2 binding to the xeroderma pigmentosum group C protein (XPC) from nuclear excision repair. *Biochemistry* 45, 3653-3663.

Yang, Y. G., Cortes, U., Patnaik, S., Jasin, M., and Wang, Z. Q. (2004). Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. *Oncogene* 23, 3872-3882.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.

You, J. S., Wang, M., and Lee, S. H. (2003). Biochemical analysis of the damage recognition process in nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 278, 7476-7485.

Yu, L., Goldberg, I. H., and Dedon, P. C. (1994). Enediyne-mediated DNA damage in nuclei is modulated at the level of the nucleosome. *J Biol Chem* 269, 4144-4151.

Yu, Y., Wang, W., Ding, Q., Ye, R., Chen, D., Merkle, D., Schriemer, D., Meek, K., and Lees-Miller, S. P. (2003). DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)* 2, 1239-1252.

Yurchenko, V., Xue, Z., and Sadofsky, M. J. (2006). SUMO modification of human XRCC4 regulates its localization and function in DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 26, 1786-1794.

Zeng, Y., and Cullen, B. R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem* 280, 27595-27603.

Zhong, Q., Boyer, T. G., Chen, P. L., and Lee, W. H. (2002a). Deficient nonhomologous end-joining activity in cell-free extracts from Brca1-null fibroblasts. *Cancer Res* 62, 3966-3970.

Zhong, Q., Chen, C. F., Chen, P. L., and Lee, W. H. (2002b). BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 277, 28641-28647.

Zhuang, J., Zhang, J., Willers, H., Wang, H., Chung, J. H., van Gent, D. C., Hallahan, D. E., Powell, S. N., and Xia, F. (2006). Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res* 66, 1401-1408.

La réponse au stress génotoxique met en jeu de nombreux facteurs cellulaires impliqués dans un réseau complexe de mécanismes visant à assurer le maintien de l'intégrité génétique de l'organisme. Ces mécanismes incluent la détection et la réparation des lésions de l'ADN, la régulation de la transcription et de la réplication et le déclenchement éventuel de la mort cellulaire.

Parmi les protéines nucléaires participant à cette réponse, les protéines kin17 sont des protéines à doigt de zinc conservées au cours de l'évolution et activées par les ultraviolets (UV) et les radiations ionisantes (RI). Nous avons montré que la protéine kin17 humaine (*HSAkin17*) est présente dans la cellule sous une forme soluble et sous une forme ancrée aux structures nucléaires. Une fraction de la protéine *HSAkin17* est directement associée à la chromatine. La protéine *HSAkin17* est recrutée sur les structures nucléaires 24 heures après traitement par différents agents induisant des cassures double-brin de l'ADN (DSB) et/ou un blocage des fourches de réplication. Par ailleurs, la réduction du niveau total de protéine *HSAkin17* sensibilise les cellules RKO aux RI. Nous présentons également des résultats impliquant la protéine *HSAkin17* dans la réplication de l'ADN. Cette hypothèse a été confirmée par la démonstration biochimique de son appartenance au complexe de réplication. La protéine *HSAkin17* pourrait donc assurer le lien entre réplication et réparation de l'ADN, un défaut de la voie *HSAkin17* entraînant une augmentation de la radiosensibilité.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les interactions entre deux mécanismes de réparation de l'ADN : la réparation par excision de nucléotides (NER) et la recombinaison non homologue (NHEJ). Le NER prend en charge une grande variété de lésions provoquant une distorsion de la double hélice d'ADN dont les dimères de pyrimidines induits par les UV. Le NHEJ assure la réparation des DSB par jonction directe des extrémités d'ADN. Nous avons utilisé un modèle syngénique de défaut de la réparation basé sur l'interférence ARN développé au laboratoire. En effet, les vecteurs dérivés du virus d'Epstein-Barr (pEBV) permettent l'expression à long terme de siRNA et l'extinction spécifique du gène cible. La réduction de l'expression de gènes impliqués dans le NER (*XPA* et *XPC*) ou le NHEJ (*DNA-PKcs* et *XRCC4*) entraîne les phénotypes attendus. Nous avons montré que la réduction du niveau de protéine XPC sensibilise les cellules HeLa à l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II qui induit des DSB, et affecte leur activité NHEJ *in vitro*. Ces résultats suggèrent que la protéine XPC pourrait être requise pour la réparation de certains types de cassures ou participer à un système global de régulation de la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN. Notre modèle ouvre donc des perspectives intéressantes pour l'étude des relations entre les différentes voies de réparation de l'ADN dans des cellules humaines.

Mots clés : stress génotoxique, réparation, cassures double-brin, NHEJ, NER, kin17, interférence ARN

The response to genotoxic stress involves many cellular factors in a complex network of mechanisms that aim to preserve the genetic integrity of the organism. These mechanisms include the detection and repair of DNA lesions, the regulation of transcription and replication and, eventually, the setting of cell death.

Among the nuclear proteins involved in this response, kin17 proteins are zinc-finger proteins conserved through evolution and activated by ultraviolet (UV) or ionizing radiations (IR). We showed that human kin17 protein (*HSAkin17*) is found in the cell under a soluble form and a form tightly anchored to nuclear structures. A fraction of *HSAkin17* protein is directly associated with chromatin. *HSAkin17* protein is recruited to nuclear structures 24 hours after treatment with various agents inducing DNA double-strand breaks (DSB) and/or replication forks blockage. Moreover, the reduction of total *HSAkin17* protein level sensitizes RKO cells to IR. We also present evidence for the involvement of *HSAkin17* protein in DNA replication. This hypothesis was further confirmed by the biochemical demonstration of its belonging to the replication complex. *HSAkin17* protein could link DNA replication and DNA repair, a defect in the *HSAkin17* pathway leading to an increased radiosensitivity.

In a second part, we studied the interactions between two DNA repair mechanisms: nucleotide excision repair (NER) and non-homologous end joining (NHEJ). NER repairs a wide variety of lesions inducing a distortion of the DNA double helix including UV-induced pyrimidine dimers. NHEJ allows the repair of DSB by direct joining of DNA ends. We used a syngenic model for DNA repair defects based on RNA interference developed in the laboratory. Epstein-Barr virus-derived vectors (pEBV) allow long-term expression of siRNA and specific extinction of the targeted gene. The reduction of the expression of genes involved in NER (*XPA* and *XPC*) or NHEJ (*DNA-PKcs* and *XRCC4*) leads to the expected phenotypes. We showed that a reduced level of XPC protein sensitizes HeLa cells to etoposide, a topoisomerase II inhibitor that induced DSB, and affects their *in vitro* NHEJ activity. These results suggest that XPC protein could be required for the repair of certain types of breaks or could participate in a global regulation mechanism of the cellular response to DNA lesions. Our model offers interesting opportunities for studying the relations between the different DNA repair pathways in human cells.

Key words: genotoxic stress, repair, double-strand breaks, NHEJ, NER, kin17, RNA interference