



HAL
open science

Implication de l'ADN polymérase eta dans la réponse aux dommages de l'ADN dans des cellules déficientes en réparation par excision de nucléotides

Annabel Quinet de Andrade

► **To cite this version:**

Annabel Quinet de Andrade. Implication de l'ADN polymérase eta dans la réponse aux dommages de l'ADN dans des cellules déficientes en réparation par excision de nucléotides. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI; Universidade de São Paulo (Brésil), 2012. Français. NNT : 2012PA11T066 . tel-00779419

HAL Id: tel-00779419

<https://theses.hal.science/tel-00779419>

Submitted on 22 Jan 2013

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE DE CANCÉROLOGIE

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

THÈSE DE DOCTORAT

EN COTUTELLE INTERNATIONALE

Disciplines : Cancérologie (Univ Paris-Sud) et Microbiologie (USP)

soutenue par

Annabel QUINET DE ANDRADE

le 30/10/2012

**Implication de l'ADN polymérase η dans la réponse aux
dommages de l'ADN dans des cellules déficientes en
réparation par excision de nucléotides**

Travail réalisé au sein des équipes « Maladie de la réparation de l'ADN » à l'Institut Gustave
Roussy (UMR8200) et « Reparo do DNA » à l'Instituto de Ciências Biomédicas II (USP)

Directeurs de thèse : Dr. Anne STARY et Pr. Carlos F. M. MENCK

Jury: Pr. Robert FUCHS (Président et Examineur)
Dr. Yvan CANITROT (Rapporteur)
Pr. Jenifer SAFFI (Rapporteur)
Pr. João A. P. HENRIQUES (Examineur)

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier à tous les membres du jury, pour avoir accepté mon invitation et de venir de loin exprès pour ma soutenance de thèse à Villejuif.

Aux Professeurs Robert Fuchs, Jenifer Saffi et João Pegas Henriques et au Docteur Yvan Canitrot qui me font l'honneur de participer de mon jury de thèse.

Cette thèse a été effectuée en cotutelle entre la France et le Brésil et elle m'a permis d'approfondir encore plus mes liens avec ces deux pays. Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr. Anne Stary et au Prof. Carlos Menck, mes directeurs de thèse, qui ont accepté le défi de codiriger une thèse de doctorat en cotutelle et sans lesquels cette thèse n'aurait pas été possible. Je voudrais leur remercier le temps et l'énergie qu'ils m'ont consacrés tout au long de ces trois années ainsi que de la confiance qu'ils m'ont accordée. Travailler avec ces deux excellents chercheurs a été une expérience extrêmement enrichissante pour moi. Je remercie particulièrement Anne qui m'a acceptée tout de suite dans son laboratoire à Paris et qui m'a formée scientifiquement en me donnant une base solide. Son encadrement m'a permis de surmonter des difficultés et à progresser sur les plans pratiques et théoriques. Je tiens à remercier vivement Menck qui m'a accueilli dans son laboratoire à São Paulo et qui, avec ses encouragements et précieux conseils, m'a donné des conditions d'avancer encore plus loin dans mes recherches et d'établir des collaborations sur des nouveaux sujets.

Je suis redevable au Dr. Denis Biard, avec qui j'ai eu l'honneur de travailler, pour son aide constante au niveau pratique et théorique. Sa rigueur et son enthousiasme m'ont été précieux.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance au Dr. Alain Sarasin pour son accueil, la confiance accordée, son aide et conseils constants au long de ces trois années.

Je tiens à remercier aussi tous les collègues de l'UMR8200 et, en particulier, Aurélie, Jacques, Emma, Émilie, Sana, Agathe, Christelle et Françoise, pour leur temps, leur aide et leur sympathie.

Je remercie chaleureusement mes collègues du laboratoire Reparo de DNA et surtout Carol, Camila, Débora, Veri, Ligia, Leticia, Alessandra pour leur aide, leurs idées

constructives, leur soutien et surtout leur amitié. Et, je remercie particulièrement à Maria Carolina S. Moraes pour m'avoir proposée de travailler ensemble sur la doxorubicine et à Alexandre Vessoni en plus pour sa collaboration dans les dernières manipulations qui m'ont permis de conclure ce travail. Le temps passé à São Paulo n'aurait pas été aussi agréable et profitable sans eux.

Un immense et chaleureux merci à ma mère et à mon père pour leur soutien et motivation constants et à qui je dédie cette thèse de doctorat.

Je remercie au CNRS (Centre National de Recherche Scientifique) et à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pour avoir contribué au financement de mon travail et, en particulier au CNRS pour avoir financé les voyages réalisés dans le cadre de la thèse en cotutelle ainsi que ma participation à trois congrès internationaux.

Enfin, je remercie le gouvernement français non seulement pour l'allocation MESR (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) qui a financé cette thèse mais pour tout le soutien pratique et financier depuis mon arrivée en France en 2004, et qui m'a permis d'aboutir à cette thèse en cotutelle.

Merci pour tout !

Muito obrigada por tudo !

Résumé

Les dommages de l'ADN interfèrent avec sa réplication et sa transcription. Ils sont en général éliminés par des mécanismes de réparation, en particulier par la réparation par excision de nucléotides (NER). Ils peuvent également être tolérés grâce à la synthèse translésionnelle (TLS). Au cours de mon travail de thèse, nous avons étudié l'implication de la voie NER et de l'ADN polymérase η (Pol η) associée à la TLS dans la réponse aux lésions de l'ADN induites par les rayons ultraviolet (UV) et par une drogue chimiothérapeutique, la doxorubicine.

Les principales lésions induites par les rayons UV sont les dimères de pyrimidine cyclobutane (CPDs) et les pyrimidines (6-4) pyrimidones (6-4PPs) qui sont éliminées par la NER. Les données obtenues sur la formation de régions d'ADN simple brin et celles du cycle cellulaire suggèrent que les lésions 6-4PPs sont tolérées par un mécanisme de réparation post-répllicative dans des cellules XP-C déficientes en NER (xeroderma pigmentosum du groupe C). Dans un second temps, mon objectif a été de déterminer la contribution de Pol η dans la prise en charge des lésions induites par les rayons UV dans les cellules XP-C. En effet, il est connu que Pol η est responsable de la réplication des CPDs, mais l'absence de Pol η dans des cellules proficientes en NER ne les rend pas hypersensibles aux rayons UV. De plus, il a été suggéré que Pol η soit impliquée dans la TLS des 6-4PPs. En réprimant par shARN l'expression du gène codant Pol η dans les cellules XP-C, j'ai réussi à établir la première lignée stable de fibroblastes humains déficients à la fois en NER et en Pol η (XP-C/Pol η ^{KD}). Cette réduction fonctionnelle de l'expression de Pol η dans les cellules XP-C irradiées à faible dose d'UV a entraîné un arrêt irréversible du cycle cellulaire, la génération de cassures simple- et double-brin de l'ADN et une mortalité cellulaire significative. Ces résultats montrent un rôle crucial de Pol η dans la survie des cellules déficientes en NER après irradiation UV et suggèrent que Pol η puisse participer aussi à la TLS des 6-4PPs.

Par ailleurs, nous avons montré que les cellules déficientes en NER ou en Pol η ont été sensibilisées par un traitement à la doxorubicine indiquant que la NER et Pol η participent également de la prise en charge des lésions induites par cet agent.

Donc au cours de mon travail de thèse, j'ai mis en évidence des interconnexions complexes entre Pol η et la voie NER en réponses à différents agents génotoxiques.

Resumo

Os danos do DNA interferem com a sua replicação e transcrição. Eles são normalmente removidos por mecanismos de reparo, como o reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Lesões não removidas também podem ser toleradas por processos específicos de síntese de translesão (TLS). Durante este trabalho de tese, estudamos a implicação da via NER e da DNA polimerase η (Pol η), associada à TLS, na resposta aos danos no DNA provocados pela irradiação ultravioleta (UV) e por um agente quimioterápico, a doxorrubicina.

As principais lesões provocadas pela luz UV são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e as pirimidinas (6-4) pirimidonas (6-4PPs) que são removidas pelo NER. Os resultados obtidos sobre a formação de regiões de DNA simples fita e os dados de ciclo celular indicam que as lesões 6-4PPs são toleradas por um mecanismo de reparo pós-replicativo em células XP-C deficientes em NER (xeroderma pigmentosum do grupo C). Em seguida, buscamos determinar a contribuição da Pol η na tolerância de lesões UV em células XP-C. De fato, é conhecido que a Pol η é responsável pela replicação dos CPDs, porém a ausência dessa em células proficientes em NER não as torna hypersensíveis à irradiação UV. Além disso, foi sugerido que Pol η poderia estar envolvida na TLS dos 6-4PPs. A expressão do gene POLH, que codifica Pol η , foi silenciada através de shRNA em células XP-C, sendo assim estabelecida a primeira linhagem estável de fibroblastos humanos deficientes em ambas proteínas XPC e Pol η . Essa redução funcional da expressão de Pol η em células XP-C provocou, em células irradiadas com doses baixas de luz UV, uma parada irreversível no ciclo celular, a formação de quebras no DNA (incluindo quebras simples e dupla fita) e morte celular. Esses resultados revelam um papel crucial da Pol η na sobrevivência das células deficientes em NER após irradiação UV e sugerem que Pol η possa também participar da TLS de lesões tipo 6-4PP.

Por outro lado, participei de trabalho no qual demonstramos que células deficientes em NER ou em Pol η são sensibilizadas pelo tratamento com doxorrubicina, o que indica que o NER e a Pol η participam da resposta aos danos induzidos por esse agente.

Em conclusão, ao longo do meu trabalho de tese, eu coloquei em evidência interconexões complexas entre a Pol η e o NER em resposta a diferentes agentes genotóxicos.

Liste d'abréviations

Cellules : nombre de cellules

6-4PP : pyrimidines (6-4) pyrimidones

A, T, C, G : Adénine, Thymine, Cytosine, Guanine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNsb : ADN simple-brin

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATM: Kinase mutée pour ataxia telangiectasia (Ataxia telangiectasia mutated)

ATR: Kinase liée à ATM e Rad3 (ATM- and Rad3- related kinase)

ATRIP : protéine d'interaction avec ATR (ATR interacting protein)

BER: réparation par excision de bases (base excision repair)

BRCA : cancer du sein (breast cancer)

BrdU : 5-bromo-2-deoxyuridine

CAF : caféine

CDB : cassure double-brin de l'ADN

Chk1 : kinase de point de surveillance 1 (checkpoint kinase 1)

CPD : dimère de pyrimidine cyclobutane (cyclobutane pyrimidine dimer)

CS : syndrome de Cockayne (Cockayne syndrome)

CSB : cassure simple-brin de l'ADN

DAPI: 4',6' di Amidino-2-Phényl Indole

DDB : protéine de liaison au dommage de l'ADN (DNA damage binding protein)

DNA-PKcs : sous-unité catalytique de la kinase dépendante d'ADN (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit)

DOX : doxorubicine

EBNA-1 : antigène nucléaire d'Epstein-Barr 1 (Epstein-Barr nuclear antigen 1)

FANC : groupe de complémentation de l'anémie de Fanconi (Fanconi anemia complementation group)

GGR : réparation du génome global (global-genome repair)

IF : immunofluorescence

J/m² : joule par mètre carré

KD : réduction de l'expression d'un gène par shRNA (knock down)

lin : linéaire

log : logarithmique

LY : LY294002 (inhibiteur de PI3K)

MDC1: Protéine 1 de point de surveillance médiatrice de dommage de l'ADN (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1)

MMR : réparation de mésappariements (mismatch repair)

NER : réparation par excision de nucléotides (nucleotide excision repair)

NER+ : fibroblastes compétents en NER

NHEJ : ligature d'extrémités non-homologues (non homologous end joining)

NLS : signal de localisation nucléaire

pBD1045 : vecteur pEBV exprimant une séquence de shRNA ciblant le cadre ouvert de l'ARNm codant pour Pol η

pBD1047 : vecteur pEBV exprimant une séquence de shRNA ciblant la région non traduite en 3' de l'ARNm codant pour Pol η

PCNA : facteur de processivité des ADN polymérasés (proliferating cell nuclear antigen)

pEBV: vecteur dérivé du virus d'Epstein-Barr

Phase G1: phase Gap 1 du cycle cellulaire

Phase G2: phase Gap 2 du cycle cellulaire

Phase S : phase de synthèse d'ADN du cycle cellulaire

PI : iodure de propidium

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinases

PIKK : kinases liées aux PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinases-related kinases)

PIP : domaine d'interaction avec le PCNA

Pol : polymérase

Pol η : ADN polymérase η

RH : recombinaison homologue

ROS : espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)

RPA : protéine de réplication A (replication protein A)

s.e.m.: erreurs standards (standard error of the mean)

shCTL : vecteur pEBV portant une séquence de shRNA contrôle

shPOLH : shRNA dirigé contre le gène POLH

shRNA : petite séquence d'ARN en épingle à cheveux (short hairpin RNA)

siRNA : petite séquence d'ARN d'interférence (small interfering RNA)

SSA : hybridation simple-brin (single strand annealing)

Sub-G1 : phase du cycle cellulaire où le contenu en ADN est inférieur à 2N (G1)

SV40 : virus simien 40 (simian virus 40)

TCR : réparation associée à la transcription (transcription-coupled repair)

TFIIH : facteur de transcription II H (transcription factor II H)

TLS: synthèse d'ADN à travers une lésion (translesionnal DNA synthesis)

TOPBP1 : protéine 1 de liaison à l'ADN topo-II (DNA topoisomerase 2-binding protein 1)

Topo-II : ADN topoisomérase II

TTD : syndrome de Trichothiodystrophie

U2OS : lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome

UBZ/UBM : domaines d'interaction avec l'ubiquitine

UDS: synthèse d'ADN non programmée (unscheduled DNA synthesis)

XP : xeroderma pigmentosum

XP-C : XP du groupe de complémentation C (fibroblastes XP4PA)

XP-C/Pol η ^{KD} : cellules XP-C dont l'expression de Pol η a été réduite par shRNA

XP-C⁺: cellules XP-C corrigées par recombinaison homologue

XP-V: XP Variant (fibroblastes XP30RO)

γ H2AX: forme phosphorylée sur la serine 139 de l'histone variante H2AX

Liste des Figures

Figure 1. Dommages de l'ADN, mécanismes de réparation et conséquences	19
Figure 2. Spectre électromagnétique en fonction de la longueur d'onde.	22
Figure 3. Structure des dimères de pyrimidine induits par exposition aux UV	24
Figure 4. Distorsions de la double hélice d'ADN provoquées par CPD et 6-4PP.....	25
Figure 5. Détection du dommage de l'ADN par la protéine XPC en deux étapes	27
Figure 6. Voie de réparation par excision de nucléotides (NER)	30
Figure 7. Structure d'ADN polymérase.	38
Figure 8. Modèle de TLS de TT-CPD par Pol η : changement de polymérase	40
Figure 9. Les domaines des polymérase de la famille Y.....	44
Figure 10. Modèles pour la réplication de l'ADN endommagé... ..	45
Figure 11. TLS à la fourche de réplication et TLS post-réplivative.....	47
Figure 12. Modèle simplifié pour l'activation d'ATR	49
Figure 13. La recombinaison homologue	52
Figure 14. La ligature d'extrémités non-homologue (NHEJ).....	53
Figure 15. La kinase ATM et la réponse aux cassures double-brin (CDB).....	54
Figure 16. Les réponses de la chromatine à des cassures double-brin (CDB)	55
Figure 17. Mode d'action de l'inhibiteur de la topoisomérase II : DOX	57
Figure 18. Détection de la protéine XPC endogène par western blot.....	69
Figure 19. Prolifération des cellules NER+ et XP-C 72 h après 2, 5 et 10 J/m ²	70
Figure 20. Prolifération des cellules NER+ et XP-C au cours du temps après 2 J/m ² ...	71
Figure 21. Cycles des cellules NER+ et XP-C aux temps courts après 2 J/m ²	73
Figure 22. Cycles des cellules NER+ et XP-C aux temps longs après 2 J/m ²	75
Figure 23. Distribution dans les phases du cycle cellulaire après 2 J/m ²	75
Figure 24. Colocalisation de γ H2AX avec CPD/ 6-4PP après irradiation locale.....	77
Figure 25. Immunofluorescence de γ H2AX 24 h après 2 J/m ²	78

Figure 26. Cinétique de marquage de γ H2AX après 2J/m ² (immunofluorescence).....	79
Figure 27. Formation de γ H2AX après irradiation aux UVC (cytométrie de flux)	80
Figure 28. Cinétique de marquage de γ H2AX après 2J/m ² (cytométrie de flux)....	80
Figure 29. Formation de γ H2AX en fonction du cycle cellulaire après UVC.....	82
Figure 30. Distribution des cellules marquées pour γ H2AX dans les phases du cycle cellulaire à différents temps après irradiation aux UVC.....	83
Figure 31. Validation de la réduction de l'expression de Pol η dans les cellules XP-C..	86
Figure 32. Efficacité de l'inactivation du gène POLH dans les clones isolés	86
Figure 33. Les cellules XP-C/Pol η ^{KD} sont déficientes en XPC et en Pol η	87
Figure 34. Prolifération des cellules XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} en absence de traitement..	88
Figure 35. Prolifération des cellules XP-C ⁺ et XP-V après UVC \pm CAF	89
Figure 36. Prolifération des cellules XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} après UVC \pm CAF.....	90
Figure 37. Prolifération des cellules XP-C ⁺ , XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} 72 h après UVC ...	91
Figure 38. Prolifération des différents clones isolés 72 h après UVC.....	92
Figure 39. Prolifération des cellules XP-C/Pol η ^{KD} 6 jours après 2 et 5 J/m ²	92
Figure 40. Quantification de XP-C ⁺ , XP-V, XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} 6 jours post 2J/m ²	93
Figure 41. Cycles des cellules XP-V et XP-C/Pol η ^{KD} aux temps courts après 2 J/m ² ...	94
Figure 42. Cycles des cellules XP-V et XP-C/Pol η ^{KD} aux temps longs après 2 J/m ²	95
Figure 43. Distribution dans les phases du cycle des cellules XP-V et XP-C/Pol η ^{KD} après 2 J/m ²	95
Figure 44. Cinétique de formation de γ H2AX dans les cellules NER+, XP-C, XP-V et XP-C/Pol η ^{KD} exposées à 2 J/m ² (cytométrie de flux)...	97
Figure 45. γ H2AX en fonction des phases du cycle cellulaire après UVC	98
Figure 46. Distribution des cellules XP-V et XP-C/Pol η ^{KD} marquées pour γ H2AX dans les phases du cycle	99
Figure 47. Détection de cassures 0 h après UVC par le (test des comètes alcalin).....	100
Figure 48. Comètes 24 h après 2 J/m ² (test des comètes alcalin).....	101
Figure 49. Détection de cassures 24 h après 2 J/m ² (test des comètes alcalin)	102
Figure 50. Détection de CDB 24 h après 2 J/m ² (test des comètes neutre)	102

Figure 51. Représentation individuelle de chaque comète par le moment de la queue en fonction du contenu en ADN.....	103
Figure 52. Détermination du pourcentage de comètes avec queue détectées par le test des comètes en conditions alcalines et neutres 24 h après 2 J/m ²	104
Figure 53. Quantification du pourcentage de comètes avec queue 24 h après 2 J/m ² ..	105
Figure 54. Co-localisation de γ H2AX et RPA 7 h après irradiation locale à 150 J/m ²	106
Figure 55. Distribution dans les phases du cycle de XP-C ⁺ , XP-V, XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} après 2 J/m ² \pm CAF.....	108
Figure 56. Cycles cellulaires 24 h post 2 J/m ² \pm CAF	109
Figure 57. Quantification de cellules en Sub-G1 après 2 J/m ² \pm CAF.....	110
Figure 58. Prolifération cellulaire 6 jours après 2 J/m ² + CAF	110
Figure 59. Cinétique de formation de γ H2AX après 2 J/m ² \pm CAF	111
Figure 60. IF de γ H2AX 24 h après 2 J/m ² \pm CAF dans XP-C/Pol η ^{KD}	112
Figure 61. γ H2AX en fonction des phases du cycle 24 et 72 h après 2 J/m ² \pm CAF....	113
Figure 62. Quantification de cellules avec des niveaux élevés de γ H2AX 24 et 72 h après 2 J/m ² \pm CAF	114
Figure 63. Distribution des cellules γ H2AX+ dans les phases du cycle après 2 J/m ² + CAF	115
Figure 64. Comètes 24 h après 2 J/m ² + CAF (test des comètes alcalin)	116
Figure 65. Détection de cassures 24 h après 2 J/m ² + CAF (comètes - alcalin).....	117
Figure 66. Détection de CDB 24 h après 2 J/m ² + CAF (test des comètes neutre). ...	117
Figure 67. Détermination du pourcentage de comètes avec queue détectées par le test des comètes en conditions alcalines et neutres 24 h après 2 J/m ² + CAF	118
Figure 68. Quantification du pourcentage de comètes avec queue 24 h après 2 J/m ² + CAF	119
Figure 69. Réduction de l'expression de Pol η dans les cellules XP-A et DOX.....	125
Figure 70. Prolifération des cellules XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} 72 h après DOX.....	126
Figure 71. Modèle proposé pour la TLS des CPD en présence / absence de Pol η	137
Figure 72. Modèle proposé pour la TLS des 6-4PP en présence / absence de Pol η	137

Figure 73. Modèle proposé pour le rôle de γ H2AX dans l'amplification du signal en réponse au blocage des fourches de réplication (Wang et coll., 2011)141

Figure 74. Modèle proposé pour la synthèse translesionnelle des CPDs et des 6-4PPs dans des cellules humaines proficientes ou déficientes en Pol η ainsi que ses conséquences.142

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	17
I. Les dommages de l'ADN et la réponse de la cellule à ces dommages	18
II. Les dommages de l'ADN provoqués par les rayons ultraviolets	22
1. Le rayonnement ultraviolet	22
2. Les dimères de pyrimidine	23
III. Réparation par excision de nucléotides (NER).....	26
1. La voie de réparation la plus versatile	26
2. Le mécanisme de la voie NER.....	26
2.1. Reconnaissance de la lésion de l'ADN	27
2.2. Ouverture de la double hélice de l'ADN	28
2.3. Excision du fragment de nucléotides portant la lésion	29
2.4. Re-synthèse et ligature	29
3. Cinétique de réparation des lésions par la NER.....	31
IV. Le Xeroderma pigmentosum	32
1. Xeroderma pigmentosum « classique »	32
1.1. Description clinique	32
1.2. Les groupes de complémentation.....	33
1.3. La prédisposition au cancer	34
2. Xeroderma pigmentosum Variant.....	35
V. La synthèse translésionnelle (TLS)	36
1. Mécanismes de tolérance	36
2. Les ADN polymérases de translésion	37
3. ADN polymérase η et changement de polymérases	39
4. Mécanisme à deux polymérases de translésion	41
5. TLS : à la fourche ou derrière la fourche de réplication ?	45
VI. Les réponses aux dommages provoqués par les UV	48
1. ATR : régulateur majeur de la réponse aux lésions UV	48
2. Formation de γ H2AX et lésions UV	50
VII. Les cassures double-brins de l'ADN	52
1. Réparation des cassures double-brin.....	52
2. Réponse aux dommages dans le cas des cassures double-brin	54

3. Formation de γ H2AX en présence de cassures double-brin	55
4. Cassures double-brin et lésions UV	56
5. Cassures double-brin et doxorubicine.....	56
6. Apoptose	58
Objectifs de la thèse.....	59
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	61
Lignées et culture cellulaire.....	62
Traitements	63
Tests de prolifération cellulaire	63
Immunofluorescence	64
Cytométrie en flux	65
Western Blot	66
Test des comètes en conditions alcalines et neutres	67
Statistiques	67
RÉSULTATS.....	68
I. L'ADN polymérase η est cruciale pour la survie des cellules humaines XP-C irradiées à une faible dose d'UVC	69
1. Étude des réponses aux lésions provoquées par les rayons UVC dans des cellules humaines XP-C	69
1.1 Conséquences d'une irradiation à faible dose d'UVC sur la prolifération, le cycle cellulaire et la fragmentation de l'ADN des cellules XP-C	69
1.2 Étude de la formation de γ H2AX dans les cellules XP-C irradiées aux UVC.....	76
1.2.1 Étude de la formation de γ H2AX au niveau des lésions 6-4PPs et CPDs après une irradiation locale aux UVC	76
1.2.2 Étude de la formation de γ H2AX en réponse à une faible dose d'UVC	78
1.2.3 Étude de la formation de γ H2AX en fonction du cycle cellulaire..	81
2. Étude de lignées cellulaires déficientes en XPC et/ou en Pol η en réponse aux rayons UVC.....	84
2.1 Établissement de clones XP-C dont l'expression de l'ADN polymérase η est réduite par des vecteurs pEBV-shRNA	84
2.2 Étude des effets de l'irradiation à une faible dose d'UVC sur les cellules XP-C/Pol η ^{KD}	87

2.2.1	Les cellules humaines déficientes en XPC et Polη présentent les deux phénotypes XP-C et XP-V et sont très sensibles à l'irradiation aux UVC	87
2.2.2	L'exposition à une faible dose d'UVC induit des niveaux élevés de γH2AX dans les cellules XP-C/Polη ^{KD}	96
2.2.3	L'exposition à une faible dose d'UVC induit des cassures simples- et double-brins de l'ADN dans les cellules XP-C/Polη ^{KD}	100
2.2.4	Effets de la caféine sur les cellules déficientes en XPC et/ou Polη exposées à une faible dose d'UVC	107
2.2.4.1	La caféine induit l'arrêt de la réplication et la fragmentation de l'ADN des cellules XP-V, XP-C et XP-C/Polη ^{KD} irradiées aux UVC	107
2.2.4.2	La caféine induit des niveaux élevés de γH2AX et des cassures de l'ADN dans les fibroblastes déficients XPC et/ou Polη exposés à une faible dose UVC	111
II.	La protéine XPA et l'ADN polymérase η sont nécessaires pour la réparation des lésions de l'ADN induites par la doxorubicine.....	120
1.	Les cellules XP-A et XP-V sont plus sensibles que les cellules sauvages au traitement à la DOX	121
2.	L'inhibition des PI3K et PIKK par LY294002 potentialise les effets cytotoxiques de la DOX sur les cellules XP-A et XP-V	122
3.	Les fibroblastes traités à la DOX sont arrêtés en phase G2 du cycle cellulaire	122
4.	La DOX induit la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2AX (formation de γH2AX)	123
5.	Réduction de l'expression de Polη dans les cellules XP-A et traitement à la DOX	124
6.	Implication de Polη et de XPC en réponse au traitement à la DOX : résultats préliminaires avec les cellules XP-C et XP-C/Polη ^{KD}	126
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	127
I.	Réponse aux dommages des cellules XP-V irradiées aux UV: réplication des CPDs par Polη à la fourche de réplication.....	128
II.	Réponse aux dommages des cellules XP-C irradiées aux UV : TLS post-répllicative	130
1.	TLS post-répllicative dans les cellules XP-C irradiées aux UV	130
2.	TLS post-répllicative des 6-4PPs	131
3.	TLS post-répllicative des CPDs dans les cellules XP-V	132

III.	Implication de Pol η dans la réponse aux dommages des cellules XP-C irradiées à faible dose d'UVC	133
1.	Est-ce que Pol η est impliquée dans la TLS des 6-4PPs ?	133
2.	Pol η est cruciale dans la survie des cellules XP-C exposées à faible dose d'UVC	138
IV.	La formation de γ H2AX induite par l'irradiation UV	139
1.	Formation de γ H2AX en phase G1 du cycle cellulaire.....	139
2.	Formation de γ H2AX et la voie ATR	140
3.	Formation de niveaux élevés de γ H2AX	141
V.	Implications de Pol η et de la voie NER en réponse à des drogues chimiothérapeutiques	143
	Références bibliographiques.....	145
	Annexes.....	154
I.	Article soumis: "DNA polymerase η is critical for human Xeroderma Pigmentosum group C cells to recover from low-dose UVC irradiation"	
II.	Article publié dans Cancer Letters en 2012: "Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions"	

INTRODUCTION

I. Les dommages de l'ADN et la réponse de la cellule à ces dommages

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'information génétique et il doit donc être extrêmement stable. Cependant, il est constamment soumis à des agents génotoxiques, d'origine externe ou interne. La composition physico-chimique de l'ADN rend cette molécule susceptible à des modifications de sa structure sous l'action de ces agents. Ces modifications de l'ADN sont de nature très variée et elles sont réunies sous le terme générique de lésions de l'ADN. Le plus souvent, les lésions représentent un danger pour la cellule voire même pour l'ensemble de l'organisme. En effet, la persistance de lésions dans le génome peut conduire à la mort cellulaire ou à une instabilité génétique, point de départ de la tumorigénèse. La Figure 1 résume les origines des différentes lésions de l'ADN ainsi que leur prise en charge différentielle par les voies de réparation et leurs conséquences à court et long terme.

Les dommages de l'ADN peuvent être provoqués par des agents d'origine externe, comme les radiations ionisantes, les rayonnements ultraviolets, l'exposition à des polluants, comme la fumée de cigarette qui contient, entre autres, des hydrocarbures aromatiques cycliques. D'autre part, les produits du métabolisme, comme les espèces réactives de l'oxygène (en anglais, reactive oxygen species, ROS), sont capables d'induire des dommages au niveau de l'ADN (Hoeijmakers 2001; Hoeijmakers 2009) et sont ainsi un danger constant pour la cellule.

Les lésions de l'ADN sont très diverses. Par exemple, la formation de liaisons covalentes entre deux bases présentes sur le même brin ou sur l'un et l'autre brin d'ADN conduit respectivement à des pontages intra- ou inter-brin. Par ailleurs, la rupture du squelette ribose-phosphate d'un brin ou des deux brins d'ADN correspond respectivement à des cassures simple- (CSB) ou double-brin (CDB). De plus, l'addition d'un groupement sur une base de l'ADN par liaison covalente produit un adduit sur l'ADN. Et, les bases de l'ADN peuvent également être oxydées. Les erreurs de réplication, les insertions ou les délétions et la présence de sites sans base (abasique), ainsi que celle de l'uracile représentent également des dommages de l'ADN (voir Figure 1) (Hoeijmakers 2001; Rass et al. 2012). Il est important de noter que, très souvent, différents types de lésions de l'ADN sont induits en même temps par un agent génotoxique.

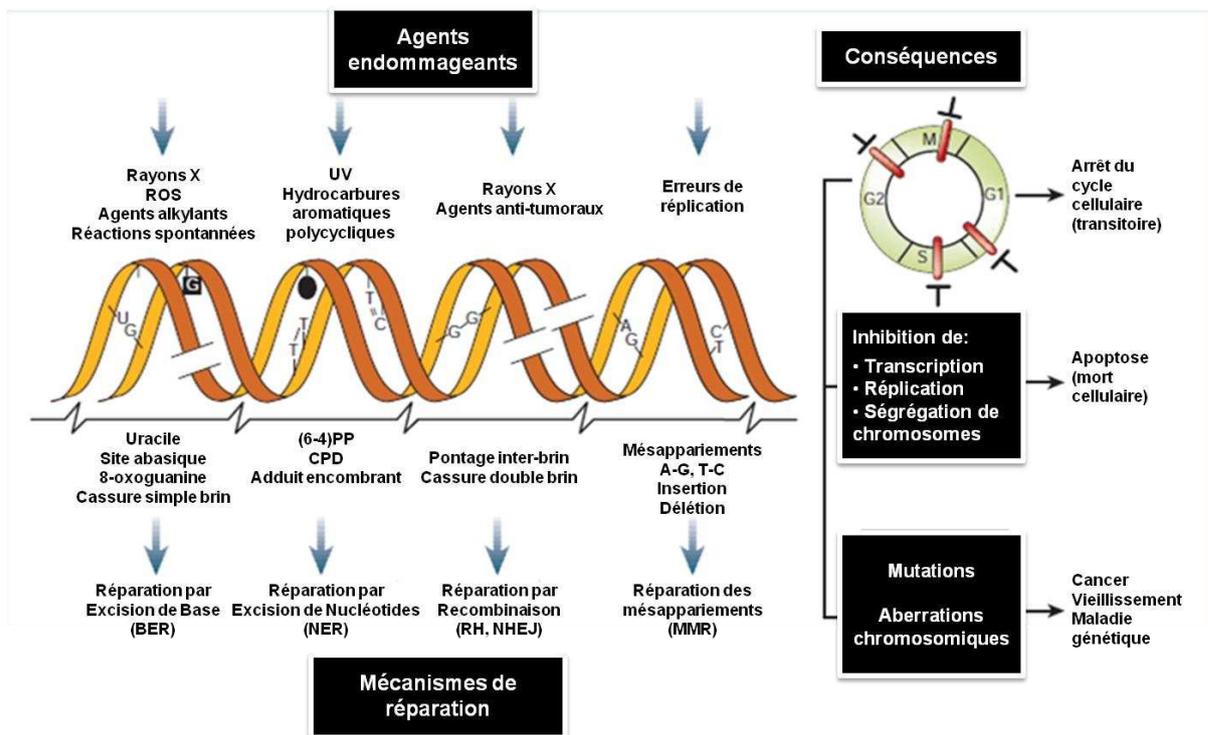


Figure 1. Dommages de l'ADN, mécanismes de réparation et conséquences. A gauche, les agents génotoxiques les plus communs (en haut), des exemples de lésions de l'ADN induites par ces agents (au milieu) et les mécanismes de réparation plus importants responsables de l'élimination de ces lésions (en bas). A droite, les effets à court terme de lésions de l'ADN sur la progression du cycle cellulaire, conduisant à un arrêt transitoire en phases G1, S, G2 ou M (en haut), ou à l'apoptose (au milieu) et les effets à long terme des dommages de l'ADN (modifications permanentes dans la séquence de l'ADN) et ses conséquences (en bas). (D'après Hoeijmakers, 2001).

La présence de dommages au niveau de la molécule d'ADN peut être létale pour la cellule ou induire une instabilité génétique, quelle soit liée à des mutations ponctuelles comme celles induites par les lésions provoquées par les rayons UV ou à des réarrangements chromosomiques induits par les CDB, par exemple. L'instabilité génétique peut mener à la tumorigénèse chez l'individu ou à des anomalies chez sa descendance. Pour contrecarrer les effets délétères des lésions, les cellules possèdent des mécanismes de réparation de l'ADN, conservés au cours de l'évolution. Différentes voies de réparation ont été mises en place, ce qui permet de recouvrir le large spectre de dommages de l'ADN (Figure 1). Cinq mécanismes de réparation ont été décrits et sont actuellement bien connus. La réparation par excision de bases (en anglais, base excision repair, BER) permet d'éliminer les uraciles, les bases oxydées, ainsi que de réparer des

CSB de l'ADN. L'importance de ce mécanisme est liée au fait que l'ADN est à tout instant susceptible de réagir avec des ROS produits constamment dans la cellule. Par ailleurs, la voie de réparation par excision de nucléotides (en anglais, nucleotide excision repair, NER) est impliquée dans la prise en charge de lésions qui provoquent une distorsion importante de la double hélice de l'ADN. Celles-ci peuvent être des pontages intra-brins de l'ADN ou encore des adduits encombrants. Cette voie sera détaillée ultérieurement. De plus, les CDB de l'ADN sont les lésions les plus graves car elles peuvent conduire à des réarrangements chromosomiques. Il existe deux mécanismes qui permettent de réparer ce type de dommage, la recombinaison homologe (RH) et la voie de ligature d'extrémités non-homologue (en anglais, non homologous end joining, NHEJ). Ces voies seront présentées dans la dernière section de cette introduction. Enfin, les erreurs de réplication ou d'appariement sont prises en charge spécifiquement par la voie de réparation des mésappariements (en anglais, mismatch repair, MMR) (Figure 1) (Hoeijmakers 2001; Rass et al. 2012).

Il est intéressant de noter que si aujourd'hui nous associons chaque mécanisme de réparation à un certain type de lésion, il est de plus en plus admis que ces voies se croisent et que les protéines connues pour agir au sein d'une voie peuvent également être impliquées dans une autre (Rass et al. 2012). Par exemple, il a été proposé que les ponts inter-brins de l'ADN (en anglais, DNA interstrand crosslink, ICL) comme ceux provoqués par le cisplatine peuvent être réparés par un mécanisme qui dépend à la fois de la NER et du mécanisme de RH (McHugh et al. 2001; Deans & West 2011).

Pour que la réparation de dommages de l'ADN soit correctement effectuée, la cellule doit arrêter sa progression dans le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est composé de la mitose (étape de division d'une cellule en deux cellules-filles identiques) et de l'interphase. Celle-ci est subdivisée en trois phases, la phase G1 (de l'anglais, Gap 1), la phase S, de synthèse d'ADN et la phase G2 (de l'anglais, Gap 2). A la transition de chaque phase du cycle cellulaire, il existe des points de surveillance (en anglais, checkpoints) qui contrôlent l'intégrité du matériel génétique au moment du passage de la cellule à la phase suivante de son cycle (Hoeijmakers 2001; Jackson & Bartek 2009; Rass et al. 2012). En effet, une cellule qui présente un ADN endommagé en phase G1 doit pouvoir réparer la lésion avant son entrée en réplication. Si la cellule endommagée est arrivée en phase S ou si elle a été exposée à un agent génotoxique à ce moment, il est important qu'elle ne puisse pas entrer en mitose.

Les mécanismes de réparation et les points de surveillance font partis des réponses aux dommages de l'ADN (en anglais, DNA damage response, DDR) qui représentent un réseau complexe de signalisation et de maintien de l'intégrité génomique (Jackson & Bartek 2009). De façon schématique, ces réponses ont lieu de façon séquentielle, la première étape étant la détection de la lésion. Celle-ci peut être due au blocage physique de la transcription ou de la réplication par ces lésions ou par des protéines capables de reconnaître les dommages de l'ADN. Ceci déclenche une cascade de signalisation cellulaire dont la transduction du signal dépend des kinases clés ATM (de l'anglais, Ataxia Telangiectase Mutated), ATR (de l'anglais, ATM and rad3-related) et DNA-PKcs (de l'anglais, DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit), membres de la famille PIKK (de l'anglais, phosphoinositol-3-kinase, PI3K, like kinase) (Shiloh 2003). L'amplification du signal aboutit à l'arrêt transitoire du cycle cellulaire, au remodelage de la chromatine, à la modulation de la transcription, et à la réparation de la lésion (Jackson & Bartek 2009).

Lorsque les dommages sont trop importants, la cellule peut être détruite suivant un mécanisme de mort programmée, ou apoptose (Hoeijmakers 2001). D'ailleurs, la stratégie des traitements anti-tumoraux, qu'ils soient par radiation ionisante ou via administration de drogues chimiothérapeutiques, porte sur l'endommagement du matériel génétique des cellules cancéreuses afin de les conduire à la mort.

Des défauts dans la signalisation ou dans la réparation des dommages sont associés à une instabilité génétique et au développement tumoral. Et, les mutations de gènes impliqués dans la DDR prédisposent les individus aux cancers héréditaires. Par exemple, des mutations hétérozygotes sur le gène codant BRCA1, protéine impliquée dans la RH (Rass et al. 2012), chez les femmes augmentent leur probabilité de développer un cancer du sein et des ovaires (Miki et al. 1994). Ceci met en évidence l'importance de l'efficacité de la DDR pour le maintien de l'intégrité génomique d'une cellule normale. Néanmoins, de la même façon, la DDR peut être responsable de la résistance à un traitement anti-tumoral d'une cellule cancéreuse (Jackson & Bartek 2009).

II. Les dommages de l'ADN provoqués par les rayons ultraviolets

Un des agents génotoxiques d'origine exogène le plus étudié et le plus carcinogène chez l'homme est le rayonnement ultraviolet.

1. Le rayonnement ultraviolet

Le Soleil émet un spectre lumineux très hétérogène. Celui-ci est composé de lumière visible (longueurs d'onde comprises entre 400 et 700 nm) et invisible (les rayons ultraviolets entre 200 et 400 nm et les rayons infrarouges compris entre 700 et 10 000 nm) (Figure 2). Les effets maléfiques du soleil sur la santé des individus sont dus à l'émission des rayons ultraviolets (UV), même si ceux-ci ne représentent que près de 6% du spectre électromagnétique solaire. En effet ces rayons présentent les plus courtes longueurs d'onde émises par le soleil et sont par conséquent les plus énergétiques. Ils sont ainsi capables de modifier la structure de différentes biomolécules des organismes vivants. L'effet le plus dangereux est celui sur le matériel génétique car, comme nous l'avons déjà décrit, la formation de dommages au niveau de l'ADN peut conduire à la mort cellulaire ou à la tumorigénèse.

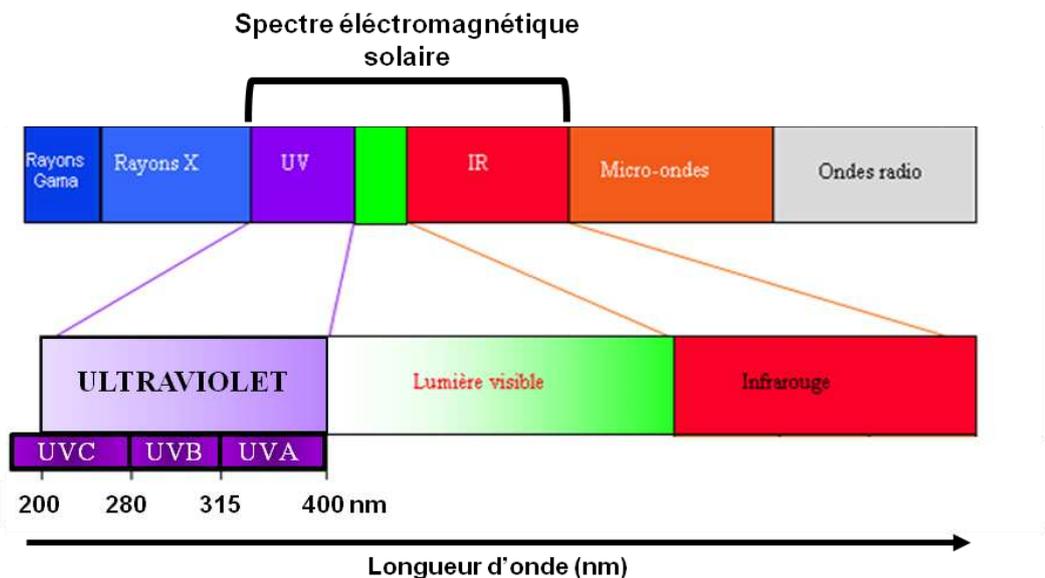


Figure 2. Spectre électromagnétique en fonction de la longueur d'onde. Le spectre électromagnétique solaire est détaillé et les trois types de rayonnements ultraviolets (UV) sont représentés.

Les rayons UV peuvent modifier la structure de la molécule d'ADN de façon directe ou indirecte. En fonction de leur activité biologique, les rayons UV ont été subdivisés en trois plages de longueurs d'onde (Figure 2). Les rayons UV de plus longue longueur d'onde, dits rayons UVA (entre 315 et 400 nm), sont les moins énergétiques et donc peu absorbés par l'ADN. Néanmoins, ils peuvent conduire à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et par conséquent, endommager l'ADN via oxydation des bases (Piette et al. 1986; Darr & Fridovich 1994). Par ailleurs, les photons émis par les rayons UVB et en particulier les rayons UVC, dont la longueur d'onde (entre 200 et 280 nm) est proche de celles des rayons X (Figure 2), sont très énergétiques et leur absorption par l'ADN conduit à la formation de pontages intra-brins (Kuluncsics et al. 1999). Donc la nature chimique ainsi que l'efficacité de formation de lésions au niveau de l'ADN dépendent étroitement de la longueur d'onde du rayon UV incident sur la cellule.

Près de 95% des rayons UV qui atteignent la surface terrestre sont de type A. Les autres 5% correspondent à des rayons UVB alors que ceux de type C sont entièrement bloqués par les molécules d'oxygène et d'ozone qui constituent la couche d'ozone. Bien que les rayons UVC ne représentent pas le rayonnement UV qui irradie les organismes terrestres, ceux-ci constituent le bon modèle expérimental pour étudier spécifiquement les pontages intra-brins de l'ADN provoqués par une exposition aux UV. Effectivement, une étude a montré que le rapport entre ce type de lésion de l'ADN et les bases oxydées après une irradiation aux UVA était de 3 à 5 alors qu'une exposition aux UVC a provoqué près 170 fois plus de pontages intra-brins de l'ADN que de bases oxydées (Kuluncsics et al. 1999).

2. Lésions de l'ADN provoquées directement par les rayons UV : les dimères de pyrimidine

Les principales lésions de l'ADN directement provoquées par les rayons UV sont des pontages intra-brins de l'ADN. Plus précisément, l'énergie émise par des photons UV peut conduire à une liaison covalente entre deux bases de type pyrimidine adjacentes, formant ainsi un dimère de pyrimidines (Pfeifer 1997; Gillet & Schärer 2006). Les deux types de lésions de l'ADN majoritairement formées après exposition aux rayons UV sont les cis-syn dimères de pyrimidines cyclobutane (en anglais, cyclobutane pyrimidine dimer, CPD) et les pyrimidines (6-4) pyrimidones (6-4PP).

Les CPDs sont formés par cycloaddition sur les doubles liaisons entre les carbones 5 et 6 de deux pyrimidines côte à côte. Il se forme un cycle cyclobutane entre les deux bases adjacentes qui sont ainsi dimérisées (Figure 3). La majorité des CPDs est formée entre deux thymines consécutives (TT-CPD), mais des dimères TC-CPD, CT-CPD et CC-CPD peuvent également se former en fonction de la longueur d'onde et de la dose d'UV (Gillet & Schärer 2006; Li et al. 2006).

Les 6-4PPs résultent de la formation d'une liaison covalente entre les carbones 6 et 4, comme le nom de la lésion l'indique, de deux pyrimidines adjacentes (Figure 3). Ce type de dommage implique des TC, CC et TT, selon la longueur d'onde des rayons UV et les séquences de nucléotides adjacentes (Pfeifer 1997; Gillet & Schärer 2006).

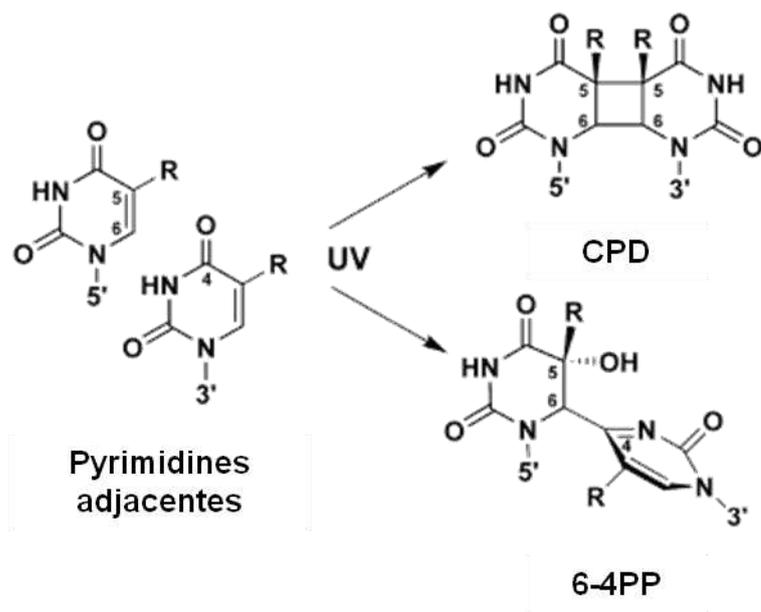


Figure 3. Structure des dimères de pyrimidine induits par exposition aux UV. Formation de dimères de pyrimidine cyclobutane (CPD) et de pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4PP) à partir de deux pyrimidines adjacentes (D'après Li, J. et coll., 2006)

Bien que les CPDs et les 6-4PPs soient formés simultanément suite à une exposition aux rayons UV, ces deux types de dommages de l'ADN sont très différents. Tout d'abord, les CPDs, et en particulier les TT-CPD, sont les lésions de l'ADN provoquées majoritairement par les rayons UV. Et, même si les 6-4PPs sont le deuxième type de lésion plus fréquemment induit par les rayons UV, ils sont formés avec un taux de 25-30% de celui des CPDs (Mitchell 1988). Par ailleurs, la différence dans la structure de chacun des types de dimère (Figure 3) conduit à une déformation plus ou moins importante de la double hélice de l'ADN. Les CPDs induisent une légère

distorsion dans la structure de l'ADN, pouvant varier de 7 à 30° par rapport à la conformation normale de l'ADN, sans affecter l'appariement de bases entre les deux brins. A l'inverse, les 6-4PPs provoquent des distorsions de près de 44° de la double hélice d'ADN, ce qui conduit à la perte d'appariement de bases au site de la lésion. (Gillet & Schärer 2006; Rastogi et al. 2010) La Figure 4 montre les distorsions de la double hélice provoquées par des dimères de type CPD et 6-4PP.

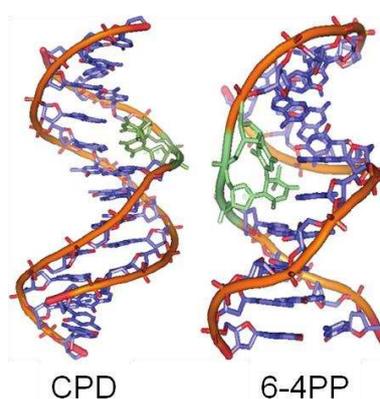


Figure 4. Distorsions de la double hélice d'ADN provoquées par chacun des types de dimères de pyrimidine, CPD et 6-4PP. Les lésions sont représentées en vert et nous pouvons voir que le dimère de type 6-4PP induit une déformation beaucoup plus importante de l'ADN que celui de type CPD. (D'après Rastogi R.P. et coll., 2010)

La dimérisation de bases pyrimidiques adjacentes interfère avec des mécanismes moléculaires essentielles pour la cellule, comme la réplication (Lehmann 1978; Hoeijmakers 2001) et la transcription (Tornaletti & Hanawalt 1999; Hoeijmakers 2001). En effet, la distorsion de la double hélice d'ADN bloque la progression des ADN polymérase répliquatives, en particulier les ADN polymérase (Pol) δ et ϵ chez les eucaryotes, ainsi que la transcription effectuée par des ARN polymérase, telle que l'ARN Pol II. La présence de telles lésions de l'ADN peut ainsi conduire d'une part à la mort cellulaire et d'autre part à la mutagénèse (Hoeijmakers 2001; Batista et al. 2006; Batista et al. 2009). Le principe de la mutagénèse induite par irradiation UV sera détaillé dans le chapitre IV. La mort cellulaire et la mutagénèse sont impliquées, respectivement, dans les processus de vieillissement et de tumorigénèse.

Il est établi que la formation de CPDs est impliquée dans la mutagénèse et l'induction d'apoptose (Donahue et al. 1994; You et al. 2001). Il a été proposé que le rôle de ce type de lésion est plus important que celui des 6-4PPs dans ces processus induits par les rayons UV mais ceci est encore controversé (de Lima-Bessa et al. 2008; Batista et al. 2009).

III. Réparation par excision de nucléotides

1. La voie de réparation de lésions de l'ADN la plus versatile

Les lésions de l'ADN provoquées par les rayons UV, CPDs et 6-4PPs, décrites ci-dessus, sont normalement éliminées par un mécanisme de réparation par excision de nucléotides (en anglais, nucleotide excision repair, NER). Ce mécanisme a été mis en évidence à partir d'ADN endommagé par les rayons UV (Boyce and Howard-Flanders, 1964 ; Petitjohn and Hanawalt, 1964 ; Rasmussen and Painter, 1964 ; Setlow and Carrier, 1964), mais il est maintenant établi que la voie de NER est capable de réparer une large gamme de lésions de l'ADN (Gillet & Schärer 2006). En effet, depuis les années 2000, divers travaux ont montré que le mécanisme de NER est également impliqué dans la prise en charge de dommages de l'ADN provoqués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (présents dans la fumée de cigarette) mais aussi par des drogues chimiothérapeutiques comme le cisplatine (Bowden et al. 2010; Graf et al. 2011; Enoiu et al. 2012) et la doxorubicine (Spencer et al. 2008; Carvalho et al. 2010; Saffi et al. 2010).

2. Le mécanisme de la voie NER

Le principe du mécanisme de NER est retrouvé chez des procaryotes ainsi que des eucaryotes, bien que les protéines impliquées ne soient pas conservées. Nous expliciterons ici les différentes étapes et protéines de ce mécanisme telles qu'elles sont connues chez les eucaryotes (Hanawalt 2002; Costa et al. 2003; Gillet & Schärer 2006; Hoeijmakers 2009).

La voie de NER est composée d'une machinerie complexe de protéines recrutées de façon séquentielle au site de la lésion de l'ADN. De façon schématique, le mécanisme se décompose en quatre étapes : (1) Reconnaissance de la lésion, (2) Ouverture de la double hélice de l'ADN, (3) Excision du fragment de nucléotides portant la lésion et (4) Synthèse d'un nouveau fragment d'ADN et ligature.

Le mécanisme de NER est divisé en deux sous-voies, en fonction du mode selon lequel le dommage de l'ADN est reconnu (Hanawalt 2002). En effet, le blocage de l'ARN polymérase II par des lésions de l'ADN est la première étape de la réparation par excision de nucléotides couplée à la transcription (en anglais, transcription coupled repair, TCR). La sous-voie TCR est donc responsable de l'élimination des lésions sur le brin transcrit de l'ADN au niveau des gènes exprimés (Hanawalt 2002). Par ailleurs, les

lésions présentes tout au long du génome sont prises en charge par la voie de réparation par excision de nucléotides du génome global (en anglais, global genome repair, GGR) après avoir été reconnues par le complexe XPC/hHR23B (Sugasawa et al. 1998).

Je détaillerai brièvement les différentes étapes de la voie NER telles qu'elles sont présentées dans la Figure 6 et d'après des révisions sur le sujet (Costa et al. 2003; Gillet & Schärer 2006; Fagbemi et al. 2011; Naegeli & Sugasawa 2011).

2.1. Initiation du mécanisme NER : reconnaissance de la lésion de l'ADN

Dans le cas de la sous-voie GGR, le complexe XPC-hHR23B est responsable de la détection des dommages de l'ADN. La protéine XPC se trouve complexée avec le produit du gène hHR23B et présente sous cette conformation une affinité pour une variété de lésions de l'ADN. La protéine XPC est capable de reconnaître directement la lésion au niveau de l'ADN. Il a été proposé que la protéine XPC reconnaît d'abord les bases non appariées à cause de la déformation de l'ADN (voir chapitre II) en amont de la lésion puis se fixe sur le l'ADN en face de la lésion (Figure 5) (Camenisch et al. 2009).

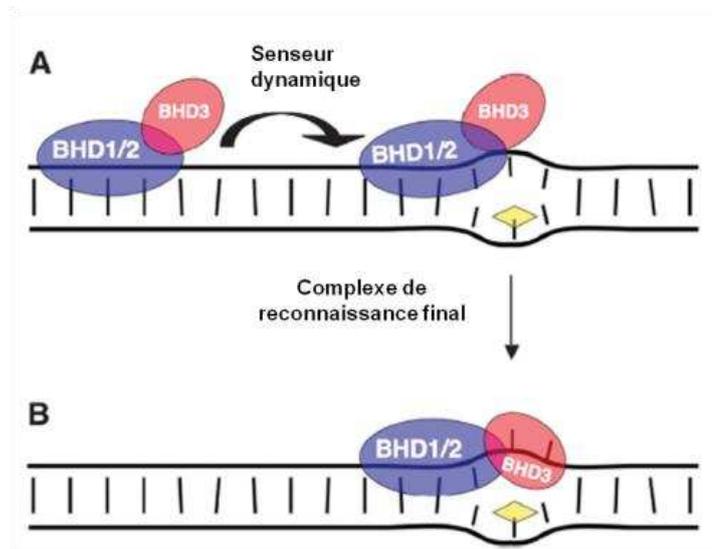


Figure 5. Détection du dommage de l'ADN par la protéine XPC en deux étapes. Modèle présentant le changement entre un senseur dynamique de dommage et un complexe de reconnaissance ultime dans lequel les domaines β -hairpin (BHD) 1, 2 et 3 de la protéine XPC sont impliqués. (A) Reconnaissance rapide de bases non appariées par un senseur, composé de BHD1 et BHD2, résultant dans un intermédiaire nucléoprotéique labile ; (B) BHD3, capable de se lier à de l'ADN simple-brin, se fixe sur le fragment d'ADN extrudé (en face de la lésion) et permet ainsi la transition à un complexe de reconnaissance stable (D'après Camenisch et coll. 2009).

Lorsque le complexe XPC-hHR23B est fixé sur l'ADN, la structure locale de la double hélice est déformée (Janicijevic et al. 2003) facilitant ainsi le recrutement des autres protéines de la voie de NER. Toutefois, dans certains cas, l'affinité de ce complexe est réduite, comme dans le cas des dimères de pyrimidine de type CPD. Une explication possible est que la distorsion de la double hélice d'ADN provoquée par ces lésions n'affecte pas l'appariement de bases et est donc trop subtile pour être reconnue par le complexe XPC-hHR23B. Néanmoins d'autres facteurs peuvent coopérer avec ce complexe dans la détection des lésions. En effet, le complexe UV-DDB (de l'anglais, DNA damage binding protein) composé des protéines XPE (ou DDB2) et p127 (ou DDB1) augmente l'affinité de la protéine XPC pour certains types de lésions (Fei et al. 2011). UV-DDB recruterait le complexe XPC-hHR23B au niveau de lésions pour lesquelles ce complexe seul a peu d'affinité (Fei et al. 2011).

Par ailleurs, les complexes XPC-hHR23B et UV-DDB ne sont pas nécessaires à l'initialisation de la TCR. Dans ce cas, la première étape du mécanisme de réparation est l'arrêt de la transcription via le blocage de l'ARN polymérase II par des lésions de l'ADN (Hanawalt 2002). L'ARN polymérase II bloquée est déplacée et/ou dissociée de l'ADN, afin de permettre l'accès à la machinerie de NER au site de la lésion. Les protéines nécessaires à ce stade sont CSA et CSB. Bien qu'il soit établi que ces deux protéines jouent un rôle essentiel dans la TCR, leurs fonctions exactes restent à être élucidées.

2.2. Ouverture de la double hélice de l'ADN

Après la détection de la lésion, les voies GGR et TCR se chevauchent et une structure ouverte complexe est formée dans le voisinage de la lésion. Ceci nécessite l'action coordonnée des protéines TFIIH, XPA et RPA.

Le complexe TFIIH (de l'anglais, transcription factor II H) est constitué de plusieurs sous-unités telles que les protéines XPB et XPD. Celles-ci présentent une fonction hélicase dépendante de l'ATP et ont des activités complémentaires. Tandis que la protéine XPB ouvre le double-brin de l'ADN de 3' vers 5', l'hélicase XPD le fait dans la direction opposée (Naegeli & Sugawara 2011).

Lorsque la double hélice est ainsi ouverte, l'ADN se trouve sous sa forme simple-brin. Afin de stabiliser cette forme et éviter son clivage par des endonucléases, la protéine de réplication A (en anglais, replication protein A, RPA) se lie à l'ADN simple-brin. Ce complexe de trois sous-unités est impliqué dans la pleine ouverture de

la double hélice autour de la lésion puisqu'il se lie au brin intact de l'ADN. De plus son association avec la protéine XPA conduit au recrutement des protéines impliquées dans la formation du complexe de pré-incision (Gillet & Schärer 2006).

2.3. Excision du fragment de nucléotides portant la lésion

Après l'ouverture de l'hélice d'ADN et la formation d'un complexe protéique autour de la lésion, un fragment d'ADN est incisé de part et d'autre du dommage par des endonucléases XPG et ERCC1-XPF. L'assemblage de ces endonucléases ne se produit pas simultanément. En effet, l'endonucléase XPG est recrutée précocement au complexe de pré-incision. Bien que la présence de la protéine XPA semble ne pas être nécessaire à son recrutement, l'activité endonucléase de la protéine XPG dépend de la coopération entre les protéines XPA et RPA. Contrairement à l'endonucléase XPG, le recrutement du complexe ERCC1-XPF à l'ADN endommagé dépend de la protéine XPA (Fagbemi et al. 2011).

Le positionnement correct de ces deux endonucléases est un élément crucial pour l'incision correcte autour du fragment endommagé. La liaison de l'ADN simple-brin intact par la protéine RPA est nécessaire au recrutement du complexe ERCC1-XPF au brin endommagé, et l'interaction de RPA avec XPA peut faciliter ou même stabiliser le positionnement de ce complexe sur le brin lésé (Gillet & Schärer 2006).

Lorsque le complexe de pré-incision est assemblé, l'activité catalytique des endonucléases se met en place de façon séquentielle. Les protéines ERCC1-XPF et XPG catalysent respectivement les incisions en 5' et 3' du brin d'ADN. Le clivage de l'ADN de part et d'autre de la lésion est catalysé d'abord par le complexe ERCC1-XPF puis par l'endonucléase XPG (Fagbemi et al. 2011). Un fragment de 24-30 nucléotides portant la lésion est ainsi excisé.

2.4. Re-synthèse du fragment excisé et ligature

Le complexe XPF-ERCC1, après l'étape d'incision de la voie NER, laisse un groupement hydroxyle (OH) à l'extrémité 3' de la brèche (en anglais, gap) créée par l'excision de l'oligonucléotide endommagé. Cette extrémité 3'OH libre peut être utilisée comme une amorce d'ADN par les ADN polymérases et aucune modification additionnelle n'est nécessaire pour démarrer la synthèse d'ADN.

A ce stade la plupart des protéines de la machinerie du NER se dissocient de l'ADN sauf la protéine RPA. En effet cette protéine est, d'une part, indispensable pour

protéger l'ADN simple-brin de l'action de nucléases et, d'autre part, centrale dans l'assemblage de la machinerie de réplication.

La re-synthèse d'ADN est faite à partir du brin complémentaire d'ADN intact. Elle est prise en charge par les Pol répliquatives δ et ϵ , par la Pol de transléision κ (Ogi et al. 2010), ainsi que par la protéine PCNA (de l'anglais, Proliferating Cell Nuclear Antigen), facteur de processivité pour les polymérasés.

Enfin, la cascade de la machinerie de NER est complétée par une ligature de l'extrémité 5' du brin d'ADN au nouveau fragment synthétisé par les Ligases I et III (Moser et al. 2007).

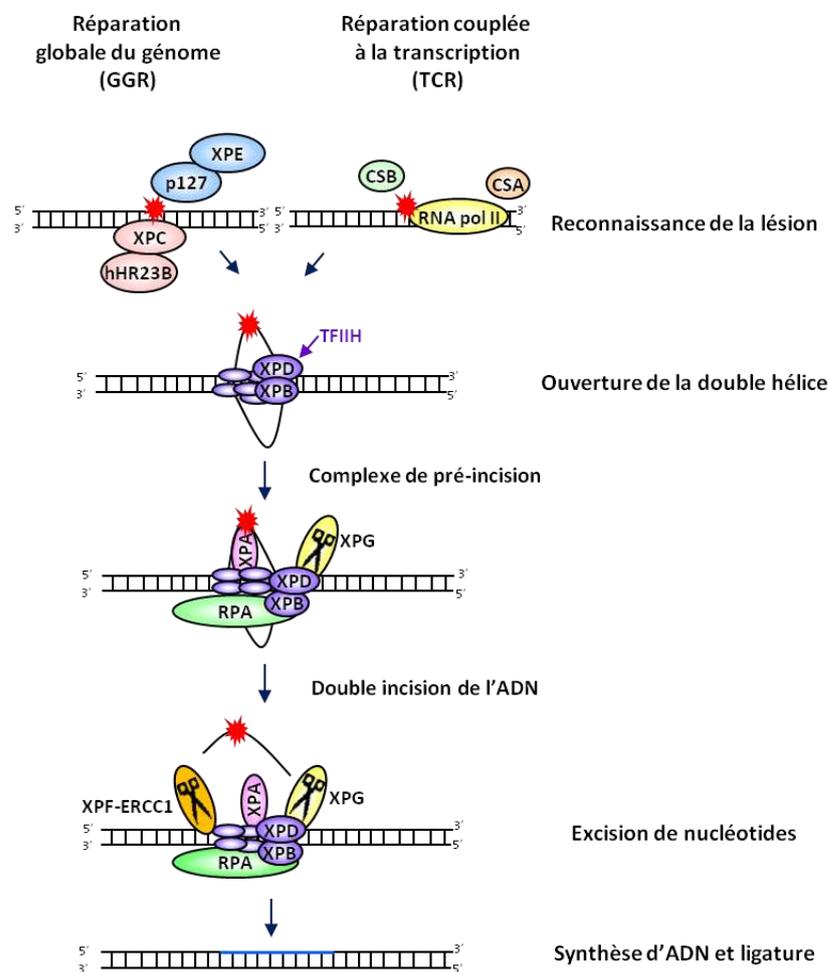


Figure 6. Schéma simplifié de la voie de réparation par excision de nucléotides (NER) dans les cellules de mammifères. La première étape, celle de reconnaissance de la lésion, est la seule différence entre la réparation globale du génome (GGR) et celle couplée à la transcription (TCR). Les étapes suivantes sont identiques pour les deux sous-voies : ouverture de la double hélice de l'ADN, double incision de part et d'autre de la lésion permettant l'excision du fragment portant la lésion puis re-synthèse de ce fragment d'ADN et sa ligature. (D'après Ortolan, T., 2008)

3. Cinétique de réparation des dommages de l'ADN par la voie

NER

Étant donné la complexité de la voie de NER et du large spectre de lésions de l'ADN pris en charge par ce mécanisme, la cinétique de réparation des dommages par cette voie est également très variable (Costa et al. 2003).

Dans le cas des deux lésions majoritairement provoquées par les rayons UV, les 6-4PPs sont réparés beaucoup plus rapidement que les CPDs. En effet, les 6-4PPs sont complètement éliminés du génome en 4 heures suivant l'irradiation à 15 J/m² d'UVC alors que 24 heures après l'irradiation près de 50% des CPDs sont toujours détectés (Riou et al. 1999). Les mêmes résultats ont été obtenus après irradiation avec 10 J/m² d'UVC (Matsumoto et al. 2007). Ceci peut s'expliquer par le fait que les 6-4PPs induisent une distorsion plus prononcée de la double hélice que les CPDs et seraient ainsi plus rapidement reconnus par le complexe XPC-hHR23B du GGR.

Par ailleurs, il a été proposé que les lésions présentes dans les régions transcrites de l'ADN sont réparées plus rapidement que celles dans les régions non codantes (Pfeifer 1997). En effet, 80% des CPDs sur les régions codantes de l'ADN sont réparés 8 heures après l'irradiation, en contraste avec 15-30% de ceux présents sur les régions non codantes (Mellon et al. 1987). La réparation plus rapide des lésions dans les régions codantes est attribuée à une plus grande efficacité de la sous-voie TCR par rapport à la GGR (Pfeifer 1997). Cependant, l'efficacité de la TCR peut dépendre des séquences de bases environnant la lésion (Pfeifer 1997).

En résumé, la cinétique d'élimination des lésions par la voie NER dépend du type de lésion et, en particulier de l'importance de la distorsion de l'ADN provoquée, mais aussi de sa localisation dans le génome. Dans le cas des CPDs, sa réparation dépend de l'efficacité de la TCR et est très peu prise en charge par la GGR, alors que celle-ci assure l'élimination rapide des 6-4PPs. Nous pouvons ainsi conclure que les dimères de pyrimidine de type 6-4PP sont complètement éliminés dans les premières heures suivant une exposition aux UV, alors que les dimères CPDs persistent pendant plus de 24 heures dans le génome des cellules humaines.

IV. Le Xeroderma pigmentosum

Il existe trois maladies génétiques autosomiques récessives liées à une déficience en NER, le xeroderma pigmentosum (XP), la trichothiodystrophie (TTD) et le syndrome de Cockayne (en anglais, Cockayne syndrome, CS). Bien que les phénotypes présentés par les patients atteints de chacun de ces syndromes soient très variables, les trois syndromes conduisent à des conditions de vie très dures et très souvent à une mortalité très précoce par rapport à la population générale. Ceci met en évidence l'extrême importance du mécanisme de NER.

Dans ce manuscrit je me concentrerai uniquement sur la seule de ces trois maladies qui est associée à la survenue de cancers, le xeroderma pigmentosum (Stary & Sarasin 2002; Cleaver 2005).

1. Le xeroderma pigmentosum « classique »

1.1. Description clinique

Le xeroderma pigmentosum (XP) est une maladie monogénique autosomique récessive rare dont la fréquence est d'environ 1:250,000 en Europe et en Amérique du Nord mais varie selon le pays. Elle est caractérisée par une hypersensibilité aux rayons UV du soleil associée à l'apparition très précoce de nombreuses altérations cutanées sur les parties du corps du patient exposées au soleil, comme des kératoses actiniques et des cancers de la peau.

Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1882 par le dermatologue Moritz Kaposi Kohn, qui a baptisé cette maladie héréditaire à ce terme en raison de ses caractéristiques cliniques. Dès sa première exposition aux rayons du soleil, le bébé atteint de XP a de graves brûlures (dermatite solaris), érythème et la présence de bulles au niveau de la peau exposée. Les symptômes suivants sont sécheresse (xeroderma) et épaissement prononcés de la peau et apparition de taches de rousseur ainsi qu'une hyperpigmentation de la peau (pigmentosum). L'âge moyen de l'apparition de tumeurs cutanées chez les patients XP est de 8 ans, 50-60 ans plus tôt que celui dans la population générale. Entre 20 et 30% des patients XP présentent des anomalies neurologiques caractérisées par mort neuronale précoce, retard mental progressif et microcéphalie (Stary & Sarasin 2002).

1.2. Les groupes de complémentation

L'étude de cellules isolées à partir de biopsies de patients XP a permis de révéler que l'hétérogénéité du phénotype XP est associée à une hétérogénéité génétique. Des tests de complémentation basés sur la correction de la synthèse non programmée de l'ADN (en anglais, *unscheduled DNA synthesis*, UDS) après irradiation UV, correspondant à l'étape de re-synthèse d'ADN de la NER (chapitre III), ont été réalisés à partir de la fusion de cellules issues de deux patients XP différents. Si la cellule hybride résultante de la fusion des cellules est capable de faire de l'UDS après irradiation UV, alors elle a été complémentée et par conséquent les deux cellules de départ présentent des défauts dans deux protéines différentes et constituent ainsi deux groupes de complémentation. Ceci a conduit à l'identification de sept groupes de complémentation pour le XP : de XP-A à XP-G, dits XP classique (Deweerdk.Ea et al. 1972; Stary & Sarasin 2002; Lehmann et al. 2011).

Des mutations dans les gènes XP conduisent à la déficience en NER et à l'hypersensibilité aux rayons UV. La fréquence et la distribution géographique varient selon le groupe de complémentation (Stary & Sarasin 2002). Les groupes les plus fréquents, représentant près de 90% des patients XP classiques, sont XP-A (surtout au Japon), XP-C et XP-D (en Europe et aux EUA). Les autres 10% sont constitués des groupes XP-B, XP-E, XP-F et XP-G, pour lesquels moins de 20 patients ont été enregistrés dans chaque groupe (Stary & Sarasin 2002).

L'hypersensibilité aux rayons du soleil, la prédisposition au cancer ainsi que les anomalies neurologiques sont associés à un défaut dans une des protéines impliquées dans la voie de réparation des lésions provoquées par les rayons UV, la NER. Le gène impliqué et le type de mutation de ce gène déterminent les caractéristiques cliniques de la pathologie du patient XP ainsi que son espérance de vie. Les patients présentant des mutations dans des gènes impliqués uniquement dans la sous-voie GGR (XPC et XPE) ne présentent quasiment pas de symptômes cliniques en dehors des cancers cutanés. En particulier, les cellules issues de patients XP du groupe C ont une activité résiduelle de NER de 15 à 30% grâce à la TCR et sont ainsi moins sensibles que les cellules XP du groupe A ou D pour lesquelles plus de 95% de la fonctionnalité de NER est perdue (de Boer & Hoeijmakers 2000). Les patients avec des mutations dans les gènes dont les produits constituent la voie commune du mécanisme de NER (XPA, XPB, XPD, XPF et

XPB) présentent des symptômes cliniques très complexes qui impliquent le système nerveux central et d'autres organes (Cleaver 2005).

De façon intéressante, un phénotype moins grave comme celui observé chez les patients XP du groupe F peut être le résultat d'une activité résiduelle de la voie NER. En fait, les rares patients XP-F présentent une fraction de protéine XPF fonctionnelle et les mutations conduisant à l'absence totale de cette protéine ne sont probablement pas viables chez l'homme (Lehmann 2003).

1.3. La prédisposition au cancer

Les patients XP ont près de 2000 fois plus de tumeurs de la peau que les individus de la population générale. Et, l'inactivation des gènes murins homologues aux gènes XPA et XPC clonés chez l'homme conduit à une augmentation de la survenue de cancers de la peau chez des souris (Kraemer 1997). Étant donné que la tumorigénèse implique des multiples mutations, en particulier de gènes suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes, le fait que l'absence de réparation de dommages provoqués par les rayons UV conduise à des tumeurs indique une corrélation directe entre la persistance de ces dommages et l'induction de mutations. En effet, toutes les cellules isolées de patients XP présentent une fréquence élevée de mutations (Sary & Sarasin 2002). Le spectre de mutations montre la signature typique des mutations ponctuelles induites par les UV qui sont majoritairement des transitions entre les pyrimidines C et T aux sites où deux pyrimidines sont adjacentes pouvant aboutir aussi à des doubles transitions entre CC et TT (Dumaz et al. 1993; Sarasin 1999). Cette signature est retrouvée dans le gène p53 (gène suppresseur de tumeur muté dans près de 50% des tumeurs de la peau) des cancers de la peau de patients XP, ce qui indique fortement que les lésions induites par les UV non réparées conduisent à l'initiation de la tumorigénèse (Sary & Sarasin 2002). Actuellement, il est établi que la mutagénèse induite par les rayons UV est due à la réplication des lésions provoquées par les UV par des ADN polymérases spécialisées capables de répliquer l'ADN endommagé, mais souvent au prix de mutations (Sary & Sarasin 2002; Sale et al. 2012). Ce mécanisme sera détaillé dans le chapitre V.

2. Le xeroderma pigmentosum variant

Un huitième groupe de complémentation XP a été identifié et puisque les cellules appartenant à ce groupe présentent un phénotype très différent de celles des groupes A à G, il a été nommé XP variant (XP-V) (Lehmann et al. 1975; Stary & Sarasin 2002)

Les patients XP-V correspondent à 20-25% des patients XP et sont plus sensibles aux rayons UV que les individus normaux mais moins que les patients XP classiques. Ils développent des cancers de la peau à l'âge de 20-30 ans et présentent peu ou pas d'anomalies neurologiques (Stary & Sarasin 2002; Cleaver 2005).

Les cellules XP-V présentent un défaut dans la réparation des dommages de l'ADN provoqués par les UV mais sont proficientes en NER (Lehmann et al. 1975; Kaufmann & Cleaver 1981; Cordonnier & Fuchs 1999). Bien qu'elles soient un peu plus sensibles aux rayons UV que les cellules normales (Cordonnier & Fuchs 1999), les cellules XP-V ne deviennent hypersensibles à l'irradiation UV qu'en présence de caféine (Cleaver 1989; Broughton et al. 2002). Actuellement, l'hypersensibilisation des cellules XP-V irradiées aux UV par la caféine est considérée une caractéristique de ces cellules et est même utilisée comme test diagnostique pour les patients XP-V (Broughton et al. 2002).

La forme variante du syndrome XP résulte de mutations dans le gène POLH (ou XPV) qui code pour l'ADN polymérase η (Pol η) (Johnson et al. 1999; Masutani et al. 1999; Yamada et al. 2000). Cette dernière est une polymérase spécialisée, impliquée dans la synthèse translésionnelle de l'ADN (en anglais, translesion synthesis, TLS) (Cordonnier & Fuchs 1999; Broughton et al. 2002). En particulier, elle est capable de répliquer les dimères de thymine cyclobutane, TT-CPD (Svoboda et al. 1998; Cordonnier & Fuchs 1999). En absence de Pol η , comme dans les cellules XP-V, les cellules deviennent hypermutagènes (Maher et al. 1976; Cordonnier & Fuchs 1999) et le spectre de mutations présente un nombre similaire de transitions et de transversions aux sites G/C et A/T. Ceci indique que les dommages peuvent être pris en charges par des mécanismes infidèles conduisant à des mutations, expliquant ainsi l'incidence élevée de cancers chez les patients XP-V (Cordonnier & Fuchs 1999; Stary & Sarasin 2002; Stary et al. 2003).

V. La synthèse translésionnelle

1. Mécanismes de tolérance des lésions de l'ADN

Lorsque les lésions provoquées par les rayons UV ne sont pas éliminées par les mécanismes de réparation, elles bloquent physiquement la progression des ADN polymérase répliquatives. En effet, le site catalytique de ces polymérase est compact et intolérant à la grande majorité des lésions (Sale et al. 2012). Le blocage des fourches de réplication peut avoir lieu dans les cellules où les voies de réparation sont fonctionnelles car, d'une part, toutes les lésions ne sont pas réparées avant la réplication et, d'autre part, l'ADN peut être endommagé en cours de réplication. De plus, le blocage des fourches de réplication par les lésions conduit à la formation d'ADN simple-brin (ADNsb) alors que la voie de NER dépend d'un brin intact face à la lésion pour l'étape de re-synthèse de l'ADN après excision du fragment endommagé. Le blocage prolongé des fourches de réplication peut conduire à l'effondrement (en anglais, collapse) de la fourche, à des cassures double-brin (CDB) et à une instabilité génétique. Le sauvetage des fourches de réplication bloquées et l'achèvement de la réplication sont donc essentiels pour la survie de la cellule et la préservation du génome. La résolution du blocage des fourches de réplication est prise en charge par des mécanismes de tolérance qui permettent de dépasser la lésion bloquante sans l'éliminer. Il existe deux stratégies universelles pour tolérer les lésions de l'ADN, la synthèse translésionnelle (de l'anglais, translesion synthesis, TLS) et le contournement de la lésion (en anglais, template switching) (Chang & Cimprich 2009; Livneh et al. 2010; Lange et al. 2011). La TLS sera détaillée dans ce chapitre. En ce qui concerne le contournement de lésion, la chromatide sœur, intacte et complètement synthétisée, sert de modèle pour la synthèse d'ADN en face de la lésion. Ceci peut avoir lieu par transfert physique du brin complémentaire dans un processus appelé recombinaison homologue (RH). Alternativement, la tolérance dépendante d'homologie peut également avoir lieu par régression de la fourche (Hoeijmakers 2001; Friedberg 2005; Chang & Cimprich 2009). Les mécanismes basés sur l'homologie sont connus pour être impliqués dans la réparation des CDB. Leur rôle au niveau de fourches de réplication bloquées est connu chez les procaryotes et aussi chez la levure, mais chez les cellules de mammifères, cela reste encore controversé (Friedberg 2005; Livneh et al. 2010; Petermann & Helleday 2010). De plus, il a été récemment proposé que, dans des cellules humaines, les protéines FANCD1 et FANCD2, connues pour leur rôle dans la réparation des pontages

inter-brins (en anglais, inter-strand crosslink, ICL) ainsi que les protéines impliquées dans la RH, Rad51, BRCA1 et BRCA2 prennent en charge les fourches de réplication bloquées de façon indépendante des voies établies de réparation de ICL et RH (Schlacher et al. 2012).

2. Les ADN polymérases de la synthèse translésionnelle

La TLS repose sur des ADN polymérases spécialisées (Pol TLS) qui sont capables de répliquer l'ADN à travers la lésion. En effet, les Pol TLS présentent un site actif large et sont ainsi capables d'accommoder une déformation de l'ADN, à l'inverse des ADN polymérases répliquatives δ et ϵ dont le site actif est très compact et intolérant au désalignement entre la base du brin à répliquer et le nouveau nucléotide. (Sale et al. 2012) (Voir Figure 7). Par conséquent, les Pol TLS ont une faible processivité, c'est-à-dire une faible capacité à étendre la synthèse d'ADN avant de se décrocher de l'ADN, ainsi qu'une faible fidélité. Celle-ci est renforcée par le fait que ces Pol ne possèdent pas d'activité exonucléase 3' vers 5' et qu'elles ne sont donc pas capables de corriger les erreurs d'incorporation dans le brin d'ADN en synthèse. La tolérance de lésions de l'ADN par TLS permet donc la progression de la réplication, souvent au prix de l'induction de mutations. D'ailleurs la TLS est fréquemment impliquée dans la résistance à divers agents génotoxiques (Lange et al. 2011; Sale et al. 2012).

Dans les cellules de mammifères, il existe au moins sept enzymes avec une activité TLS substantielle. Quatre d'entre elles font partie de la famille Y des polymérases : Pol η , Pol ι , Pol κ et REV1. Une TLS Pol appartient à la famille B de polymérases, Pol ζ dont la sous-unité catalytique est REV3L et deux autres font partie de la famille A des polymérases, Pol θ et Pol ν . Chacune d'entre elles présente un profil unique de tolérance des lésions et de fidélité (Lange et al. 2011).

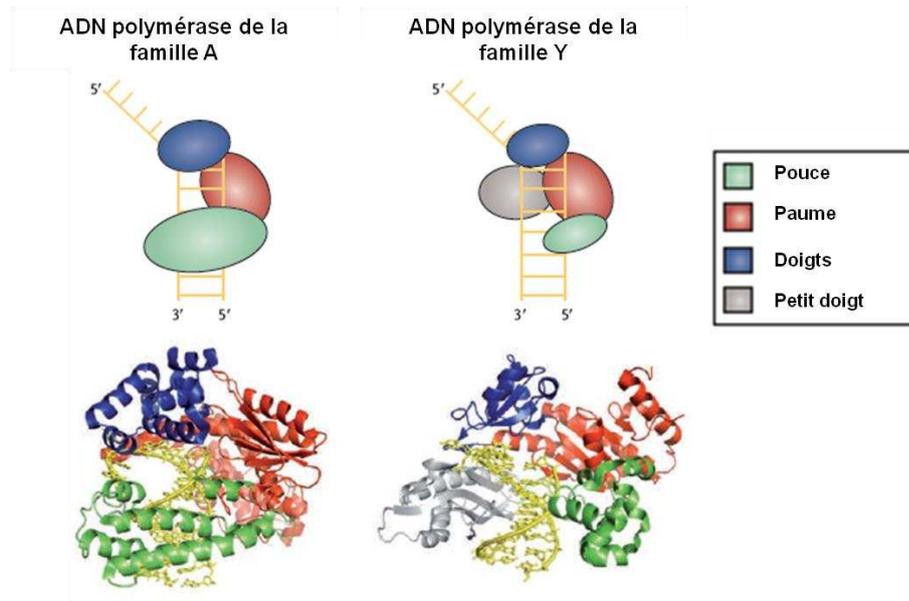


Figure 7. Structure d'ADN polymérases. Les ADN polymérases ont un domaine structural souvent comparé à une « main droite », dans laquelle l'ADN se lie à la « paume » et est entouré par les domaines dits « doigts » et « pouce ». Les polymérases de la famille Y ont des domaines doigts et pouce plus petits que ceux des polymérases répliquatives, ainsi qu'un site actif spacieux qui leur permet de dépasser les lésions déformant l'ADN. Le domaine « petit doigt » qui est uniquement codé chez les enzymes de la famille Y aide les domaines courts, doigts et pouce, à stabiliser le brin d'ADN lié, mais joue aussi un rôle dans la fidélité et l'activité de réplication à travers le dommage. La figure montre une comparaison structurale du large fragment de l'ADN polymérase I de *Thermus aquaticus*, un membre de la famille A et Pol η (membre de la famille Y). La molécule d'ADN est représentée en jaune. (D'après Lange et coll., 2011)

Je détaillerai uniquement les Pol TLS des familles Y et B décrites ci-dessus et je présenterai quelques caractéristiques de chacune de ces Pol TLS ainsi que les mécanismes de TLS proposés de façon non exhaustive (Lange et al. 2011; Sale et al. 2012). Bien que de nombreuses études montrent une implication de ces Pol TLS en réponse à d'autres types de dommages, les mécanismes de TLS ont été proposés à partir d'études de lésions UV, sur lesquelles je me concentrerai.

3. L'ADN Polymérase η et le mécanisme de changement de polymérases

Le prototype des Pol TLS est l'ADN polymérase η (Pol η), dont l'altération chez l'Homme conduit à la forme variante du syndrome XP (XP-V) (Lehmann et al. 1975) que nous avons décrit dans le chapitre précédent. Pol η est la seule Pol TLS connue actuellement dont la déficience prédispose les hommes à la survenue de cancers (Lange et al. 2011).

La Pol η est principalement connue pour sa capacité à répliquer de façon fidèle et rapide les TT-CPD qui sont les lésions majoritairement provoquées par les rayons UV (Cordonnier & Fuchs 1999; Masutani et al. 2000). En effet, elle est capable d'insérer deux adénines en face d'un TT-CPD (Johnson et al. 2000b) et peut dans ce cas allonger l'amorce, ce qu'elle n'est pas capable de faire si elle insère un nucléotide incorrect (Masutani et al. 2000). Le mécanisme proposé actuellement est celui de changement de polymérases (en anglais, polymerase switch) (Friedberg et al. 2005). Selon ce modèle, lorsque la Pol répliquative est bloquée par un TT-CPD, elle est remplacée par Pol η qui prend en charge la réplification de cette lésion. Et, lorsque la tolérance du dommage est finie, la Pol répliquative est à nouveau recrutée au niveau de l'ADN afin de continuer la réplification.

Pol η est localisée dans le noyau et est recrutée au niveau de foyers de répllication pendant la phase S du cycle cellulaire (Kannouche et al. 2001; Kannouche & Stary 2003). La principale régulation de son activité est faite via son recrutement au niveau des fourches de répllication bloquées (Lehmann 2006; Sale et al. 2012). Plus précisément, le recrutement ainsi que l'efficacité de l'activité de Pol η dépendent de son interaction avec le PCNA (Kannouche et al. 2004). Le PCNA est le facteur de processivité des Pol répliquatives chez les eucaryotes. Il est composé de trois sous-unités formant un anneau qui encercle l'ADN et peut interagir directement avec les Pol répliquatives ainsi qu'avec Pol η (Kannouche et al. 2004) via le domaine PIP (de l'anglais, PCNA-interacting protein) (Naryzhny 2008). Des modifications post-traductionnelles du PCNA telles que ubiquitination, sumoylation et phosphorylation, déterminent pour quelle Pol elle a le plus d'affinité, la Pol répliquative ou Pol η . Le changement de la polymérase pour laquelle le PCNA a le plus d'affinité est la base du changement de polymérases lors de la TLS (Kannouche & Lehmann 2004; Friedberg et al. 2005) (Figure 8).

Plus précisément, le blocage des fourches de réplication conduit à l'exposition d'ADNsb après découplage entre l'hélicase MCM (de l'anglais minichromosome maintenance) et la polymérase répliquative (Chang et al. 2006). L'ADNsb est rapidement recouvert par des protéines RPA. L'association de RPA avec une ubiquitine ligase E3, Rad18, stimule la monoubiquitination du facteur PCNA par cette dernière (Kannouche et al. 2004; Davies et al. 2008). Le PCNA monoubiquitiné présente une affinité plus importante pour Pol η et cette dernière est ainsi recrutée au niveau de la fourche bloquée (Kannouche et al. 2004). Pol η synthétise les deux adénines en face du dimère TT-CPD mais aussi quelques nucléotides après la lésion, ce qui augmente la probabilité qu'elle se décroche de l'ADN (McCulloch et al. 2004). Enfin, un deuxième changement de polymérase permet le retour de Pol δ et de la réplication de l'ADN par cette Pol (Figure 8).

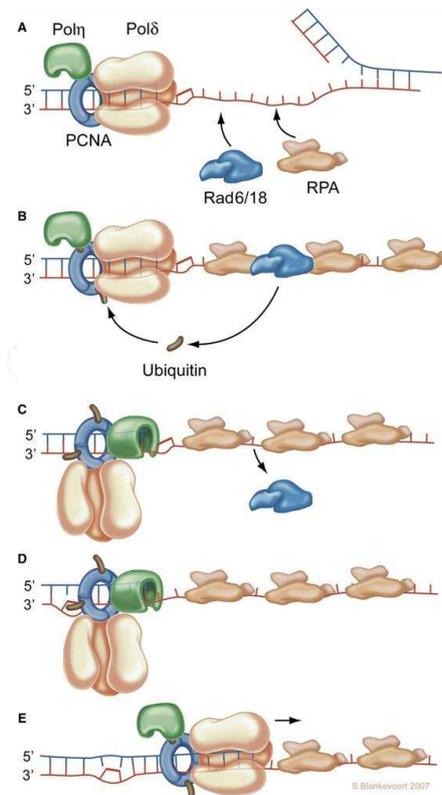


Figure 8. Modèle de synthèse translésionnelle (TLS) de TT-CPD par Pol η : changement de polymérase. (A) La Pol répliquative δ est bloquée par la lésion. RPA et Rad6/18 sont recrutés à l'ADN simple-brin (ADNsb) en aval de la lésion après l'ouverture par l'hélicase MCM. (B) Ensuite, Rad6/18 ubiquitine le PCNA (C) ce qui conduit au remplacement de la Pol répliquative par Pol η . (D) Pol η synthétise quelques nucléotides en face et après la lésion. (E) Un deuxième changement de polymérase permet le retour de Pol δ qui continue la réplication (D'après Jansen et coll., 2007).

4. Mécanisme à deux polymérases de translésion

Lorsque Pol η est absente, comme c'est le cas des cellules XP-V, d'autres Pol TLS prennent en charge les TT-CPDs, Pol ι , Pol κ et Pol ζ (Dumstorf et al. 2006; Ziv et al. 2009) et seraient ainsi responsables de la mutagenèse des cellules XP-V (Wang et al. 2007). Par contre, en opposition à la réplication des TT-CPDs par Pol η , aucune de ces Pol TLS n'est capable de répliquer ces dommages seules (Johnson et al. 2000a; Ziv et al. 2009). Par exemple, Pol ι est capable d'insérer un nucléotide mais n'est pas capable de continuer la synthèse de nucléotides alors que Pol ζ n'est capable de répliquer la lésion qu'en présence de Pol ι (Ziv et al. 2009). L'équipe de Prakash a proposé un modèle selon lequel la TLS a lieu en deux étapes, chacune d'entre elles prise en charge par une Pol TLS différente (Johnson et al. 2000a; Prakash & Prakash 2002). La première étape est « l'insertion », dans laquelle un nucléotide est placé en face de la lésion et la deuxième étape est « l'extension » où l'amorce d'ADN insérée est allongée à travers la lésion. Par conséquent, les Pol TLS peuvent fonctionner de façon spécifique en tant que Pol d'insertion ou d'extension (Prakash & Prakash 2002). Ainsi, en absence de Pol η , les TT-CPD sont répliqués par un mécanisme de deux polymérases constitué de Pol ι ou Pol κ en tant que Pol TLS d'insertions et la Pol TLS d'extension, Pol ζ (Ziv et al. 2009).

Pol ζ est constituée d'une sous-unité catalytique, REV3 et d'une sous-unité accessoire, REV7 (Murakumo et al. 2001) et elle est capable de répliquer différents types de dommages (Johnson et al. 2000a). Étant donné que la Pol ζ de mammifère n'a pas encore été purifiée, les propriétés de son homologue chez *S. cerevisiae* constituent un modèle utile, bien que la protéine des mammifères soit deux fois plus grande que celle des levures (Livneh et al. 2010). Une propriété clé de Pol ζ chez la levure est sa capacité à allonger des amorces d'ADN portant des mésappariements ou des amorces en face d'une lésion (Johnson et al. 2000a; Prakash & Prakash 2002). Plus récemment, ceci a été confirmé dans les cellules de souris et humaines dont l'expression de Pol ζ a été réprimée (Gueranger et al. 2008; Shachar et al. 2009; Yoon et al. 2010; Diamant et al. 2012; Temviriyankul et al. 2012). Cette propriété de Pol ζ a été la base du modèle de deux polymérases pour la TLS (Johnson et al. 2000a; Prakash & Prakash 2002).

La Pol κ humaine peut jouer un rôle comme Pol d'extension, comme Pol ζ (Haracska et al. 2002). Néanmoins, l'étude de la TLS à travers des cisPt-GG, adduit provoqué par le cisplatine, dans des cellules de mammifères a montré d'une part, que

Pol η ainsi que Pol κ ne présentaient que des faibles activités de Pol d'extension et, d'autre part que Pol ζ coopérait avec ces deux Pol dans la prise en charge de ces lésions (Shachar et al. 2009). Les auteurs ont proposé un modèle selon lequel les cisPt-GG sont répliqués en deux étapes où l'insertion serait effectuée par les Pol η ou Pol κ et l'extension par Pol ζ . Ils ont ainsi démontré pour la première fois un mécanisme à deux polymérases dans des cellules de mammifères.

Par ailleurs, en réponse à d'autres lésions, Pol ι et Pol κ peuvent également jouer le rôle de Pol d'insertion. Donc malgré le fait que Pol κ présente une activité de Pol d'extension *in vitro*, le scénario proposé actuellement est celui de plusieurs Pol d'insertion, comme Pol η , Pol ι et Pol κ et une seule Pol d'extension, Pol ζ (Bresson & Fuchs 2002; Prakash et al. 2005; Livneh et al. 2010).

De façon intéressante, plusieurs Pol TLS d'insertion peuvent être impliquées en réponse à un même type de lésion. Et en fonction de la combinaison de Pol TLS, la réplication d'une lésion donnée peut être fidèle ou infidèle.

Prenons le cas des 6-4PPs. L'équipe de Prakash a proposé qu'aucune Pol TLS est capable de répliquer seule les 6-4PPs (Prakash & Prakash 2002) et a montré, *in vitro*, que Pol η est capable d'insérer un premier nucléotide face au dimère TT-6-4PP et en particulier, un G face au premier T du dimère (Johnson et al. 2001). Or, lorsque Pol η insère un nucléotide incorrect, elle n'est pas capable d'allonger l'amorce (Masutani et al. 2000) et ceci a été vérifié dans le cas précis des TT-6-4PP (Johnson et al. 2001). Ce résultat a été retrouvé à partir de plasmides portant un seul dimère TT-6-4PP transfectés dans des cellules de levure ou humaines (Bresson & Fuchs 2002; Yoon et al. 2010). Donc contrairement aux TT-CPDs, Pol η peut jouer un rôle de Pol d'insertion mais doit nécessairement agir de concert avec la Pol TLS d'extension, Pol ζ (Johnson et al. 2001; Bresson & Fuchs 2002; Yoon et al. 2010). Ceci est cohérent avec le fait que les 6-4PPs provoquent une distorsion plus prononcée de la double hélice que les CPDs. Bien que Pol η ait un site catalytique plus important que celui des Pol répliquatives, celui-ci ne serait pas assez large pour prendre en charge une telle lésion. Par ailleurs, différents travaux ont montré que Pol ι peut également être une Pol TLS d'insertion lors de la réplication des TT-6-4PPs (Johnson et al. 2000a; Yoon et al. 2010). La réplication des 6-4PP par Pol η (Johnson et al. 2001; Bresson & Fuchs 2002; Yoon et al. 2010) ainsi que celle prise en charge par Pol ι (Yoon et al. 2010) sont impliquées dans la mutagenèse induite par ce type de lésion. Néanmoins, il a été proposé qu'une autre Pol

d'insertion, encore inconnue, doit être impliquée dans la tolérance fidèle des 6-4PPs (Bresson & Fuchs 2002; Yoon et al. 2010).

Un travail récent sur des fibroblastes embryonnaires de souris a proposé que le rôle de Pol η se limite principalement à la réplication des CPDs et n'est pas impliqué dans celui des 6-4PPs présents dans le génome (Temviriyankul et al. 2012). Par conséquent, il est actuellement établi que les 6-4PPs sont répliqués par un mécanisme de deux polymérase. Néanmoins, l'identité de la ou les Pol TLS d'insertion est encore objet d'étude et l'implication de Pol η reste controversée.

Nous avons vu que dans le modèle où une seule polymérase prend en charge la réplication du dommage de l'ADN il y a deux changements successifs de polymérase. Selon le modèle à deux polymérase il doit y en avoir trois et différentes études proposent que la Pol TLS REV1 soit impliquée dans ce mécanisme. REV1 est une Pol TLS très limitée car elle n'est pas capable de synthétiser un polymère d'ADN mais elle peut insérer un seul C à l'extrémité d'une amorce d'ADN face à un G ou un site abasique (Lin et al. 1999). Par ailleurs, REV1 possède non seulement un domaine d'interaction avec le PCNA monoubiquitiné mais elle peut aussi interagir directement avec les autres Pol TLS (Figure 9), ce qui suggère que REV1 pourrait avoir un rôle d'adaptateur entre le PCNA et les autres Pol TLS (Guo et al. 2006a; Guo et al. 2006b; de Groote et al. 2011; Sale et al. 2012). Il a été proposé que REV1 pourrait ainsi jouer un rôle dans le changement entre la Pol d'insertion et la Pol d'extension au niveau de la lésion de l'ADN et que ce serait son principal rôle dans la TLS (Friedberg 2005; Friedberg et al. 2005; Lange et al. 2011).

Les Pol TLS possèdent comme le PCNA des domaines d'ubiquitination (domaine UBZ/UBM) (Figure 9) et leur ubiquitination module leur affinité pour le PCNA monoubiquitiné et par conséquent leur recrutement à l'ADNsb (Bienko et al. 2005; Sale et al. 2012). Il y a donc au moins deux niveaux de régulation du recrutement des Pol TLS à l'ADN, les modifications post-traductionnelles du facteur PCNA et celles des Pol TLS. La réduction de l'affinité du facteur PCNA pour une Pol et l'augmentation de son affinité pour une autre Pol conduit au changement de polymérase au niveau de l'ADN.

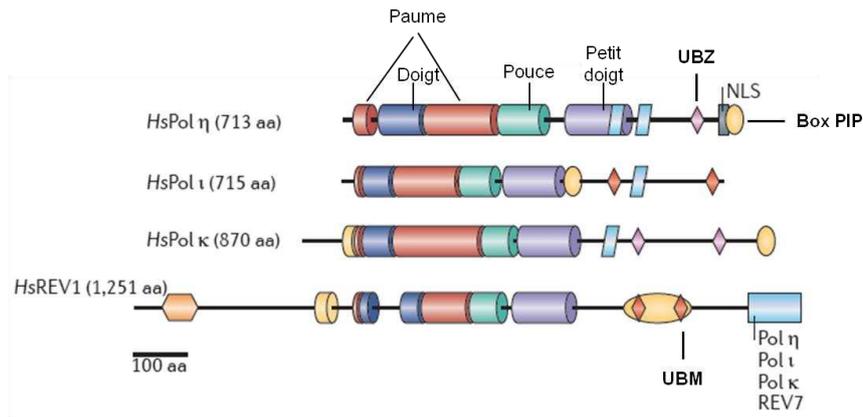


Figure 9. Les domaines des polymérase de la famille Y. Les sites actifs des polymérase (Pol) sont compris dans les domaines paume, doigt, pouce et petit doigt. Les domaines additionnels sont impliqués dans la localisation et la régulation des Pols. PIP : domaine d'interaction avec le PCNA, UBM et UBZ : domaines de liaison avec l'ubiquitine, NLS : signal de localisation nucléaire. (D'après Sale et coll., 2012)

Par ailleurs, ces Pol TLS peuvent être également impliquées dans la tolérance d'autres types de dommages que ceux provoqués par les UV. Par exemple, Polη est également impliquée dans la TLS d'adduits encombrants (Chou 2011), tels que le cisPt-GG induit par le cisplatine (Lange et al. 2011). Ceci est confirmé par le fait que les cellules XP-V sont plus sensibles au cisplatine que les cellules où Polη est fonctionnelle (Albertella et al. 2005). Par conséquent, Polη peut jouer un rôle dans la résistance de cellules cancéreuses à ce traitement (Ummat et al. 2012). Et, l'implication de Polη dans la prise en charge d'autres types de dommage est actuellement objet de nombreuses études.

Enfin, il est intéressant de noter que ces Pol TLS et, en particulier Polι et Polκ, peuvent également jouer un rôle dans l'étape de re-synthèse d'ADN des mécanismes de réparation BER et NER respectivement (Lange et al. 2011). Par ailleurs, ces Pol TLS sont aussi importantes dans l'hypermutation somatique, processus selon lequel les immunoglobulines sont gérées dans les lymphocytes B. En effet, la mutagenèse induite par ces Pol TLS permet la variabilité des immunoglobulines, essentielle pour un système immunitaire efficace (Sale et al. 2012).

5. TLS à la fourche de réplication ou derrière la fourche de réplication ?

La résolution du blocage des fourches de réplication par des lésions de l'ADN grâce à la TLS est connue depuis longtemps. Cependant si elle intervient directement au site de la fourche bloquée ou derrière elle est encore en débat (Figure 10).

Les premiers travaux sur la TLS proposaient qu'elle pouvait avoir lieu derrière la fourche de réplication (Rupp & Howard-Flanders 1968; Lehmann et al. 1975; Meneghini 1976). Néanmoins, avec la découverte des Pol TLS, il a été proposé, à l'inverse, que la TLS aurait lieu directement au site de la fourche bloquée (Cordonnier & Fuchs 1999; Friedberg et al. 2005; Lehmann & Fuchs 2006). Depuis l'année 2006, de plus en plus de publications sont en faveur d'un modèle post-réplicatif de la TLS (Heller & Marians 2006; Lehmann & Fuchs 2006; Lopes et al. 2006; Jansen et al. 2009; Diamant et al. 2012).

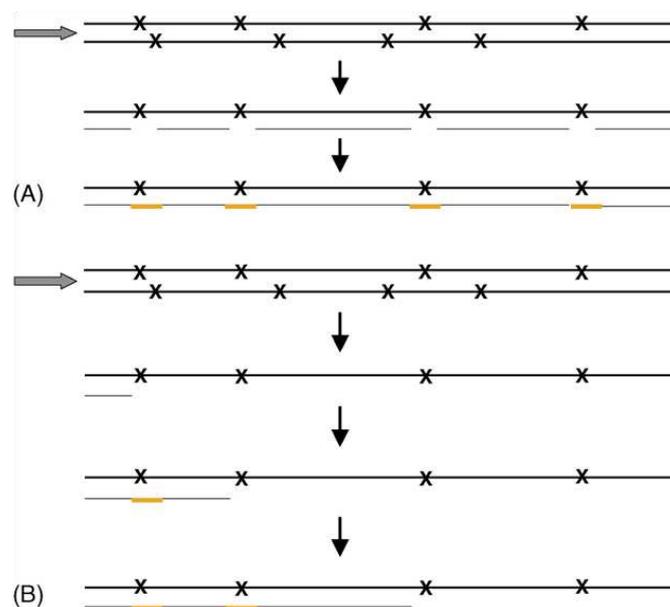


Figure 10. Modèles pour la réplication de l'ADN endommagé. Les flèches indiquent la direction de la progression des fourches de réplication. Pour simplifier, seule la réplication sur le brin direct (en anglais, leading strand) est montrée. (A) Des brèches d'ADN simple-brin (ADNsb) derrière la fourche : la réplication de l'ADN est faite de façon discontinue (trait fin), des brèches d'ADNsb sont laissées en face des lésions sur le brin parental (trait épais). La réaction de comblement de brèches (en anglais, gap-filling) (en orange) implique des Pol TLS et répliquatives ou échange de chromatides sœurs et a lieu derrière la fourche de réplication qui avance. (B) TLS à la fourche : dans ce modèle la fourche est bloquée à chaque lésion et les Pol TLS synthétisent un fragment court d'ADN (en orange) avant la reprise de la réplication. Et, le même processus a lieu à chaque lésion (D'après Lehmann et Fuchs, 2006).

Afin de mieux expliquer les mécanismes de ces deux modèles, des schémas simplifiés sont présentés dans la Figure 11. Dans ces schémas, j'ai également pris en compte le mécanisme à deux polymérase de la TLS. Le modèle selon lequel la TLS a lieu à la fourche de réplication (Figure 11A) repose sur des multiples changements de polymérase (en anglais, polymerase switch). Tout d'abord, la Pol réplicative bloquée est échangée par une Pol TLS d'insertion qui insère un nucléotide face à la lésion. Celle-ci est ensuite remplacée par la Pol TLS d'extension qui complète la TLS. Enfin, un dernier échange de Pol permet le retour de la Pol réplicative qui poursuit la réplication jusqu'à la prochaine lésion bloquante (Friedberg et al. 2005). Ce modèle correspond à celui que j'ai présenté pour la réplication des TT-CPDs par Pol η (Figure 8).

Par ailleurs, selon le modèle post-réplicatif, la synthèse d'ADN redémarre en aval des lésions et la réplication arrive ainsi à son terme, en laissant derrière elle des brèches d'ADN simple-brin (ADNsb) (en anglais, gap) (Figure 10A). Ces brèches d'ADNsb sont alors comblées derrière la fourche de réplication par un mécanisme appelé « réparation post-réplivative » (en anglais, post-replication repair) ou encore comblement de brèches post-réplivative (en anglais, post-replication gap filling). Ce processus peut être dépendant d'homologie (en anglais, template switch) comme celui que nous avons décrit précédemment, soit un mécanisme de TLS (Friedberg 2005; Lehmann & Fuchs 2006). Nous nous concentrerons sur l'implication des Pol TLS dans le comblement des brèches.

Les mécanismes moléculaires de la réparation post-réplivative sont actuellement objets de nombreuses recherches. Il a été proposé que le redémarrage de la réplication en aval de la lésion (en anglais, repriming) est pris en charge par la polymérase α (You et al. 2002; Jansen et al. 2007; Yan & Michael 2009). Pol α est la seule polymérase capable de synthétiser des amorces d'ADN de novo sur une matrice d'ADNsb (Yan & Michael 2009). Le redémarrage de la réplication par Pol α conduirait au recrutement du complexe Rad9/Hus1/Rad1, aussi appelé 9-1-1 (Yan & Michael 2009). Celui-ci est un hétérotrimère qui encercle l'ADN de façon comparable au PCNA. Si son rôle dans l'activation des points de surveillance est de plus en plus établi (Jansen et al. 2007; Yan & Michael 2009), son importance dans la TLS est encore mal compris (Lange et al. 2011).

A partir du modèle de réparation post-réplivative proposé par Jansen et coll. (2007) et de résultats obtenus par Lopes et coll. (2006), deux scénarios sont possibles

(Figures 11 B et C). Jansen et coll. (2007) ont proposé, pour la TLS des 6-4PPs, un modèle (Figure 11B) selon lequel la Pol réplicative bloquée serait remplacée par une Pol TLS d'insertion, Pol η (ou une autre Pol encore non identifiée) incapable d'insérer un second nucléotide ce qui provoquerait un second blocage de la fourche. A ce moment là, la réplication redémarrerait grâce à Pol α en aval laissant une brèche d'ADNsb. Pol ζ (ainsi que Pol κ) associée à REV1 est recrutée sur l'ADN via le facteur 9-1-1, et comblerait alors la brèche d'ADNsb (Jansen et al. 2007). Il est également possible (Figure 11C) qu'il y ait redémarrage de la réplication initiée par Pol α en aval de la fourche bloquée sans aucune intervention de Pol TLS d'insertion. Le comblement de la brèche serait assuré derrière la fourche par l'action de concert la Pol d'insertion et la Pol d'extension. En accord avec cette hypothèse, Lopes et coll. (2006) ont montré lorsque les cellules de *S. cerevisiae* irradiées aux UV sont dépourvues d'activité TLS, les fourches de réplifications ne sont pas affectées, mais plus de brèches sont détectées (Lopes et al. 2006). Ces résultats suggèrent que toutes les Pol TLS agiraient derrière la fourche et non pas directement à la fourche bloquée.

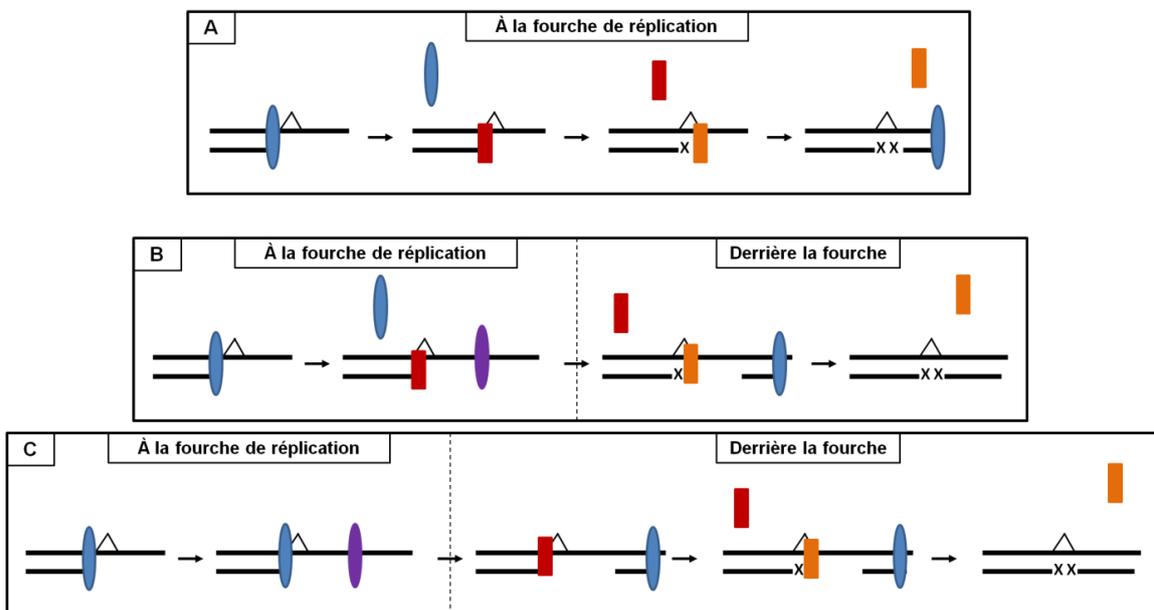


Figure 11. Schéma simplifié des deux modèles de TLS : TLS à la fourche de réplication (A) et TLS post-réplivative (B) et (C). La lésion représentée ici est un pontage intra-brin de l'ADN. L'ovale bleu représente l'ADN polymérase réplicative et l'ovale violette une polymérase prenant en charge le redémarrage de la réplication en aval de la lésion. Les rectangles rouge et orange correspondent respectivement à des Pol TLS d'insertion et d'extension. (A) La polymérase réplicative est bloquée par une lésion de l'ADN. Elle est ensuite remplacée successivement par des Pol TLS d'insertion et d'extension avant d'être recrutée à nouveau en aval de la lésion pour poursuivre la réplication. (B) La polymérase réplicative

bloquée est remplacée par une Pol TLS d'insertion incapable de poursuivre la TLS entraînant un second blocage de la fourche. Une polymérase, probablement Pol α , redémarre la réplication en aval de la lésion, laissant ainsi une brèche. Cette brèche est comblée ensuite, à la fin de la phase S ou en G2 par la Pol TLS d'extension. (C) Le redémarrage de la réplication a lieu en aval de la polymérase répliquative bloquée. La brèche créée est remplie en fin de phase S ou en phase G2 par les Pol TLS d'insertion et d'extension séquentiellement.

Dans le cas de la prise en charge d'une lésion de l'ADN par une seule Pol TLS comme Pol η au niveau des TT-CPD, le modèle de TLS à la fourche repose sur deux changements de polymérase et le seul scénario possible pour la réparation post-répliquative est celle représentée dans la Figure 11C. Il est à noter qu'il n'est pas encore établi si la réplication des CPDs par Pol η a lieu directement à la fourche (Friedberg et al. 2005; Jansen et al. 2007; Despras et al. 2010) ou selon le modèle post-répliquatif (Lehmann et al. 1975; Elvers et al. 2011; Diamant et al. 2012).

VI. Les réponses aux dommages provoqués par les rayons ultraviolets

1. ATR : régulateur majeur de la réponse aux lésions UV

Le principal régulateur de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN provoqués par les rayons UV est la kinase ATR. Celle-ci peut être activée par des régions d'ADNsb lié à la protéine RPA (Cimprich & Cortez 2008). Les régions d'ADNsb induites par l'irradiation UV peuvent être générées par le découplage entre l'hélicase MCM et la Pol répliquative bloquée par la lésion UV (Chang et al. 2006). La protéine RPA présente une grande affinité pour l'ADNsb et elle couvre tout le long du fragment d'ADNsb (Cimprich & Cortez 2008; Jones & Petermann 2012). Cette structure nucléoprotéique recrute la kinase ATR et son partenaire ATRIP (de l'anglais, ATR-interacting protein) et active ainsi la voie ATR (Cimprich & Cortez 2008; Jones & Petermann 2012) (Figure 12).

En fait, l'activation de cette voie dépend également du recrutement du complexe 9-1-1 à l'extrémité de l'ADNsb (Cimprich & Cortez 2008; Yan & Michael 2009). Ce complexe recrute la protéine TOPBP1 (de l'anglais, topoisomerase binding protein 1) qui active la kinase ATR via son interaction avec la protéine ATRIP (Cimprich & Cortez 2008; Jones & Petermann 2012). Lorsque la kinase ATR est activée, elle phosphoryle de nombreuses cibles impliquées, non seulement dans les points de

surveillance du cycle cellulaire, mais aussi dans la réparation de l'ADN (Cimprich & Cortez 2008; Auclair et al. 2009) et l'induction de l'apoptose (Jones & Petermann 2012).

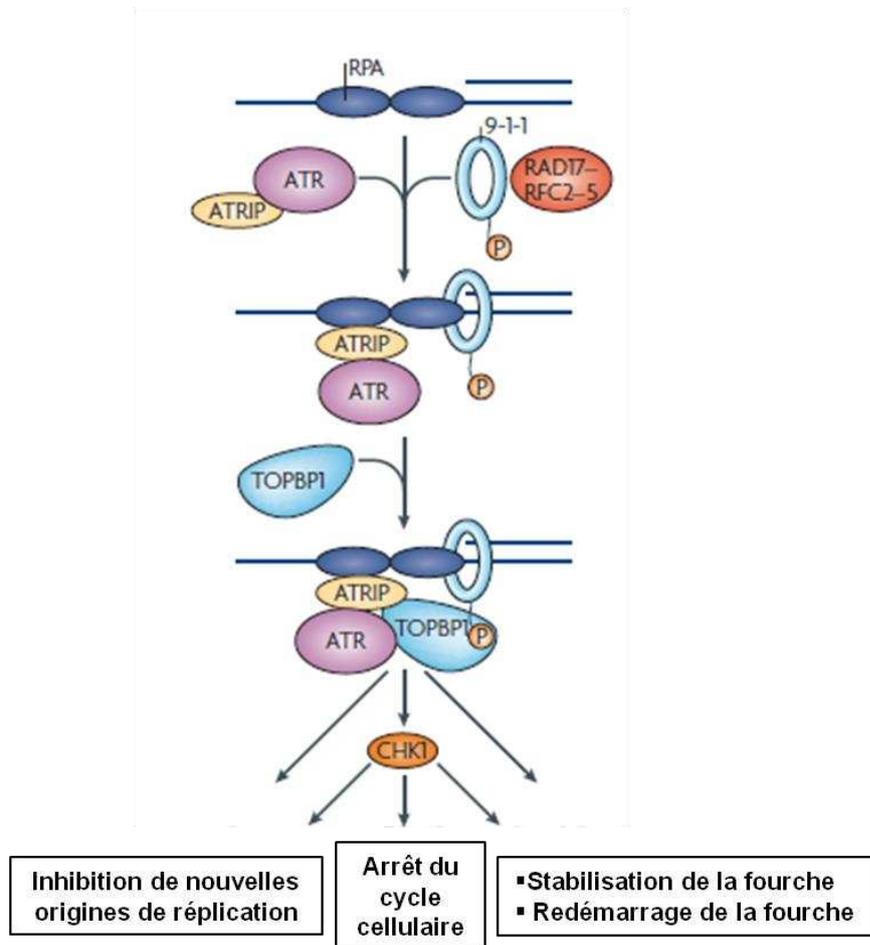


Figure 12. Modèle simplifié pour l'activation d'ATR. Deux complexes, 9-1-1 et celui composé de ATR-ATRIP, sont recrutés indépendamment à l'extrémité de l'ADNsb recouvert par RPA. Cette dernière interagit avec à la fois ATRIP et 9-1-1 et recrute la protéine TOPBP1. Celle-ci active ATR via son interaction avec ATRIP, ce qui conduit à la phosphorylation de plusieurs substrats d'ATR dont Chk1. En réponse à un stress réplicatif, représenté ici, ATR et ses effecteurs conduisent à l'inhibition de l'activation de nouvelles origines de réplication, induisent un arrêt du cycle cellulaire et stabilisent la fourche de réplication bloquée. Cette voie serait également impliquée dans le redémarrage des fourches de réplication. (D'après Cimprich et coll., 2008)

Une des cibles de la voie ATR la plus étudiée est la protéine Chk1 (de l'anglais, checkpoint 1). Il s'agit d'une kinase dont l'activation par la voie ATR est faite via la phosphorylation des Serines 317 et 345. La phosphorylation de Chk1 par la kinase ATR dépend également des protéines claspin, TIM (de l'anglais, timeless homologue) et Tipin (de l'anglais, Timeless interacting protein) (Jones & Petermann 2012). Lorsque Chk1 est phosphorylée, elle phosphoryle à son tour ses substrats. Les cibles clés de cette

kinase sont impliquées dans le contrôle des transitions entre les phases du cycle cellulaire et la voie ATR-Chk1 représente le mécanisme majeur qui régule le point de surveillance intra-S (Kaufmann 2010) ainsi que l'entrée en mitose (Cimprich & Cortez 2008). Par ailleurs, cette voie contrôle également l'activation de nouvelles origines de réplication. Et il a été récemment proposé que l'activation de la voie ATR stabilise les fourches bloquées (Despras et al. 2010; Jones & Petermann 2012). Un schéma simplifié de la voie ATR/Chk1 est présenté dans la Figure 12.

Une autre cible importante de la kinase ATR est le facteur de transcription p53 qui joue un rôle central dans la réponse des cellules aux dommages de l'ADN (Auclair et al. 2009). En ce qui concerne le cycle cellulaire, l'activation de p53 est particulièrement importante dans le point de surveillance de la transition entre les phases G1 et S.

2. Phosphorylation de l'histone H2AX et lésions UV

Une des protéines ciblées par la kinase ATR en réponse aux dommages de l'ADN provoqués par les UV est l'histone H2AX (Lukas et al. 2011).

Les histones sont des protéines qui permettent l'empaquetage et le repliement de l'ADN dans des nucléosomes, unités structurales de base de la chromatine. En effet, les nucléosomes correspondent à l'enroulement de l'ADN autour de disques protéiques constitués d'un assemblage de huit histones qui agissent ainsi en tant que bobines. Les modifications post-traductionnelles de ces protéines (acétylation, méthylation, ubiquitination, phosphorylation) permettent de moduler la condensation de la chromatine et, par conséquent, de réguler l'expression génique (Kinner et al. 2008). Il existe quatre histones, H2A, H2B, H3 et H4. Et depuis l'année 1998, la forme phosphorylée sur la sérine 139 de l'histone variante H2AX, γ H2AX, est l'objet de nombreuses études.

Rogakou et coll. ont montré, pour la première fois, la modification post-traductionnelle d'une histone en réponse à des dommages de l'ADN. L'histone H2AX est phosphorylée au niveau de la sérine 139 en réponse à la formation des cassures double-brin (CDB) (Rogakou et al. 1998; Rogakou et al. 1999). Les kinases ATM, ATR et DNA-PKcs peuvent phosphoryler H2AX et former ainsi γ H2AX (Ismail & Hendzel 2008). La formation de γ H2AX a lieu aux sites des CDBs et elle est visualisée par immunofluorescence en foyers (Ismail & Hendzel 2008). Il a été estimé que près de 2000 molécules de γ H2AX sont formées par CDB (Ismail & Hendzel 2008), ce qui fait

de l'analyse des foyers γ H2AX la technique la plus sensible pour détecter ce type de dommage. De plus, la cinétique de formation et de disparition de foyers γ H2AX coïncide avec celle de la formation et de la réparation des CDB (Ismail & Hendzel 2008). L'analyse de la formation de γ H2AX en réponse à des agents génotoxiques était devenue une stratégie très sensible pour évaluer, de façon spécifique, la formation de CDB. En effet, les mécanismes impliqués dans la réponse aux CDB sont mieux connus actuellement (Lukas et al. 2011) et seront abordés dans la dernière section de l'introduction. Néanmoins, des études de la forme phosphorylée de H2AX en réponse aux rayons UV ont remis en question le résultat établi que γ H2AX était formé uniquement en réponse à des CDB (Ismail & Hendzel 2008; Cleaver 2011; Cleaver et al. 2011).

Ward et coll. ont montré que γ H2AX pouvait être formée au niveau des fourches bloquées par les dommages provoqués par les rayons UV (Ward & Chen 2001; Ward et al. 2004). Étant donné que les rayons UV ne provoquent pas directement des CDB, il a été proposé que les fourches de réplication bloquées s'effondrent, conduisant à la formation de CDB induites par les UV (Limoli et al. 2000; Limoli et al. 2002). Par contre, la formation de γ H2AX après exposition aux rayons UV n'est pas dépendante du cycle cellulaire (Halicka et al. 2005) et la formation de CDB pendant la réplication ne permet donc pas d'expliquer la formation de γ H2AX après irradiation UV.

La formation de γ H2AX en dehors de la phase S du cycle cellulaire est liée à la présence des brèches d'ADNsb induites par la double incision au cours de la voie de NER et est effectuée par ATR (Marti et al. 2006; Hanasoge & Ljungman 2007; Matsumoto et al. 2007). Et, lorsque les cellules sont déficientes en NER, la formation tardive de γ H2AX s'expliquerait par le clivage des 6-4PPs par une endonucléase (Vrouwe et al. 2011). Par conséquent, il a été proposé que γ H2AX est formé en réponse à la présence d'ADNsb, par la kinase ATR (Vrouwe et al. 2011). De plus, Cleaver et coll. ont montré, par observation de la colocalisation de foyers γ H2AX et de 53BP1, (de l'anglais p53 binding protein 1), utilisé comme marqueur de CDB, que, même au sein de la phase S, la formation de γ H2AX n'est pas toujours liée à des CDB (de Feraudy et al. 2010).

En conclusion, si la formation de CDB conduit à la phosphorylation de H2AX, la formation de γ H2AX ne correspond pas forcément à la présence de CDB. Suite à une exposition aux rayons UV, γ H2AX semble être formé en réponse à la présence d'ADNsb mais ceci n'est pas encore établi, à ma connaissance.

VII. Les cassures double-brin de l'ADN

1. Réparation des cassures double-brin

Les cassures double-brin de l'ADN (CDB) sont les dommages le plus dangereux pour la cellule car ils peuvent conduire à des réarrangements ou aberrations chromosomiques, et par conséquent à une instabilité génétique prononcée.

Il existe deux mécanismes de réparation des CDB, la recombinaison homologue (RH) et la ligature d'extrémités non-homologue (en anglais, non homologous end joining, NHEJ). Le principal défi dans la réparation des CDB est l'absence de brin intact pour faire la re-synthèse d'ADN. Une des stratégies repose sur l'homologie présente dans la chromatide sœur, la RH (Figure 13). Ce mécanisme est extrêmement régulé et conduit, dans la majorité des cas, à la réparation fidèle des CDB (van Gent et al. 2001; Rass et al. 2012).

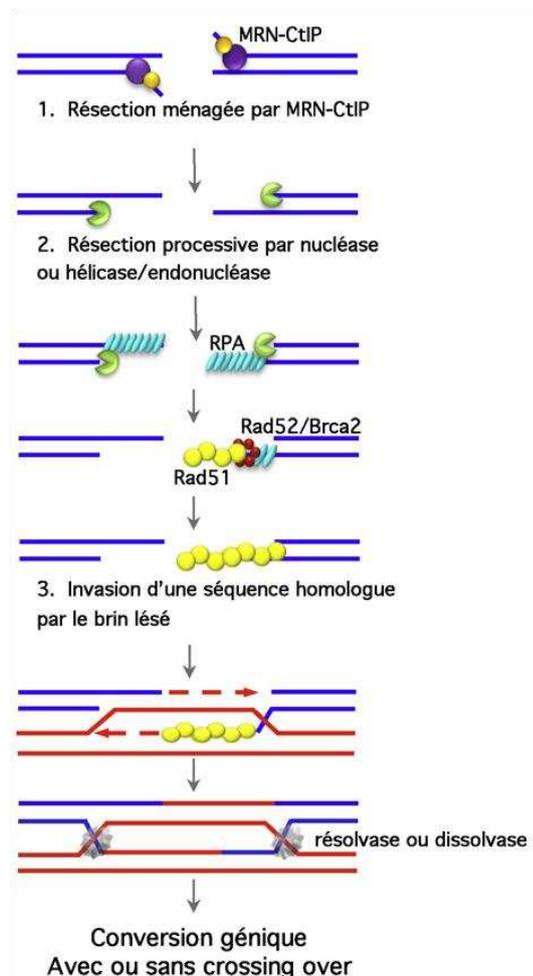


Figure 13. La recombinaison homologue. Une séquence homologue intacte est utilisée pour réparer la cassure double-brin et est initiée par une résection d'ADN simple-brin. Le modèle proposé aujourd'hui est que le complexe MRN, en association avec CtIP, initie la résection

(étape 1), ce qui permet le recrutement d'autres nucléases (comme Exo1), responsables de la formation d'extrémités sortantes simple-brin (étape 2). Ces régions simple-brin sont couvertes par la protéine RPA. BRCA2 déplace RPA et charge la protéine Rad51. L'invasion du brin lésé de la séquence homologue est médiée par le filament d'ADN simple-brin couvert de Rad51 (étape 3). Selon le sens de résolution des intermédiaires par les résolvas, la conversion génique est associée ou non à un crossing-over (D'après Rass et coll., 2012)

Néanmoins, étant donné que la base de ce mécanisme reporte sur la présence de la chromatide sœur et que la recherche de l'homologie dans le chromosome homologue serait très difficile du fait de la condensation de la chromatine (Hoeijmakers 2001), cette voie ne peut avoir lieu qu'après la réplication de l'ADN. Elle est donc limitée aux phases S et G2 du cycle cellulaire. Un autre mécanisme peut alors prendre en charge la réparation de ces lésions, la voie de ligature d'extrémités non-homologue (NHEJ) qui repose sur la jonction et ligature des extrémités (Figure 14) (Rass et al. 2012).

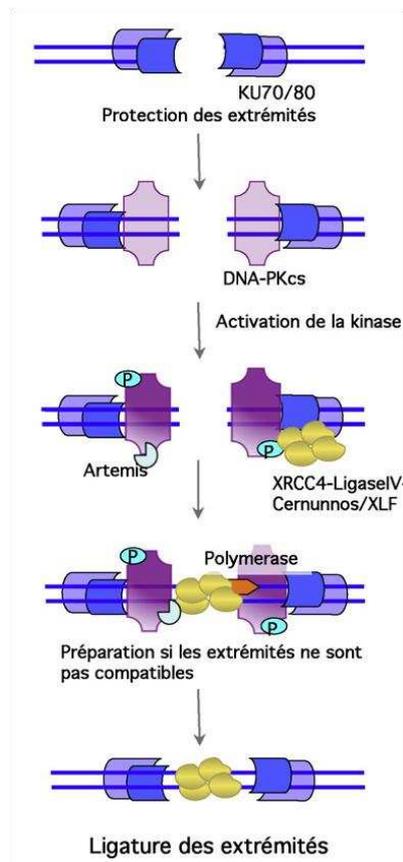


Figure 14. La ligature d'extrémités non-homologue (NHEJ). Le NHEJ ne nécessite pas d'homologie de séquence. Les extrémités d'ADN sont reconnues par l'hétérodimère Ku70/Ku80 et la sous-unité catalytique DNA-PKcs. L'activation de celle-ci permet le recrutement du complexe XRCC4/ADN ligase IV aidé par Cernunnos/XL-F. Une préparation des extrémités par la protéine Artémis et l'intervention de polymérase peuvent être nécessaires avant l'étape de ligature (D'après Rass et coll., 2012).

2. La réponse aux dommages de l'ADN dans le cas des cassures double-brin

La kinase considérée centrale dans ce cas est ATM dont le défaut conduit au syndrome qui donne son nom à la protéine Ataxia Telangiectase mutated. Les cellules de patients atteints de cette maladie sont particulièrement sensibles aux radiations ionisantes connues pour provoquer directement des CDB (van Gent et al. 2001). De façon schématique, la kinase ATM est activée par la présence de CDB. Comme la voie ATR, l'activation d'ATM déclenche une cascade de phosphorylations qui conduit à une série de conséquences comme le remodelage de la chromatine, et la réparation de l'ADN (van Gent et al. 2001; Shiloh 2003) (Voir Figure 15).

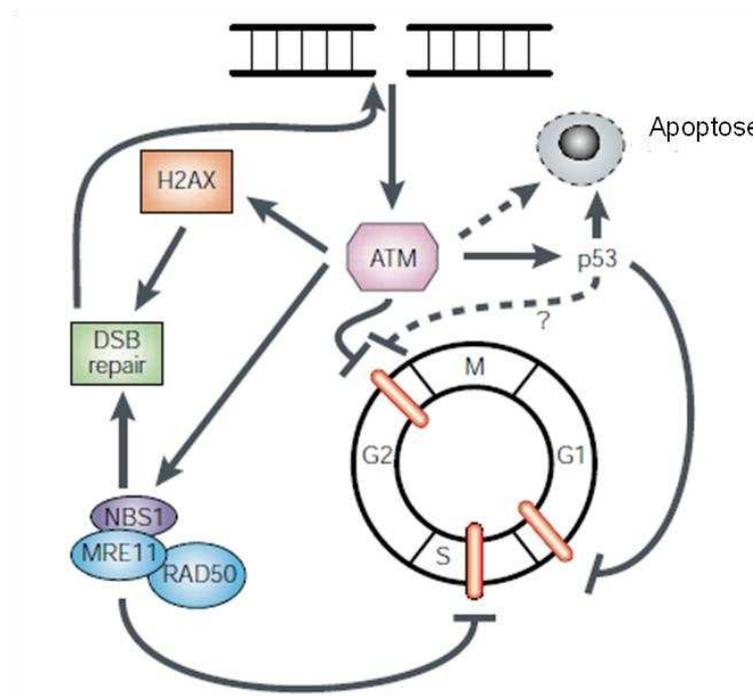


Figure 15. La kinase ATM et la réponse aux cassures double-brin (CDB). La présence de CDB conduit à l'activation d'ATM. ATM phosphoryle en aval la protéine p53, le complexe MRN et l'histone H2AX. ATM module la progression du cycle cellulaire, la réparation des CDB et éventuellement la mort programmée de la cellule (apoptose). (D'après van Gent et coll., 2001)

Bien que la voie ATR soit activée en présence d'ADNsb et la voie ATM par la formation de CDB, il est de plus en plus établie que ces deux voies se croisent et collaborent dans la réponse aux dommages de l'ADN (Bensimon et al. 2011).

L'action la plus connue de la kinase ATM sur la modulation de la chromatine est la formation de γ H2AX, citée précédemment. Si l'implication de γ H2AX est méconnue au sein de la voie ATR, celle-ci est établie en réponse à des CDBs (Lukas et al. 2011).

3. La formation de γ H2AX en présence de cassures double-brin

L'histone H2AX est phosphorylée de façon constitutive au niveau de la tyrosine 142. La phosphorylation de H2AX sur la sérine 139 par la kinase ATM a lieu simultanément à la déphosphorylation du résidu Tyr 142. Cette dernière est nécessaire à la reconnaissance de γ H2AX par son senseur MDC1 (de l'anglais, mediator of DNA damage checkpoint protein 1). Grâce à la phosphorylation constitutive de la protéine MDC1, dès qu'elle interagit avec γ H2AX, la kinase ATM activée est temporairement « ancrée » dans la chromatine grâce à la protéine Nbs1 qui fait partie du complexe MRN constitué des protéines Mre11/Rad50/Nbs1. Cette protéine Nbs1 se lie ainsi à la fois aux protéines ATM et MDC1. Ceci permet à la kinase ATM de phosphoryler les histones H2AX des nucléosomes voisins et d'amplifier ainsi le signal. Enfin, γ H2AX est déphosphorylée par la phosphatase Wip1 (de l'anglais, wild-type p53-induced phosphatase 1) pour permettre le retour de la structure initiale de la chromatine (Lukas et al. 2011) (Voir Figure 16).

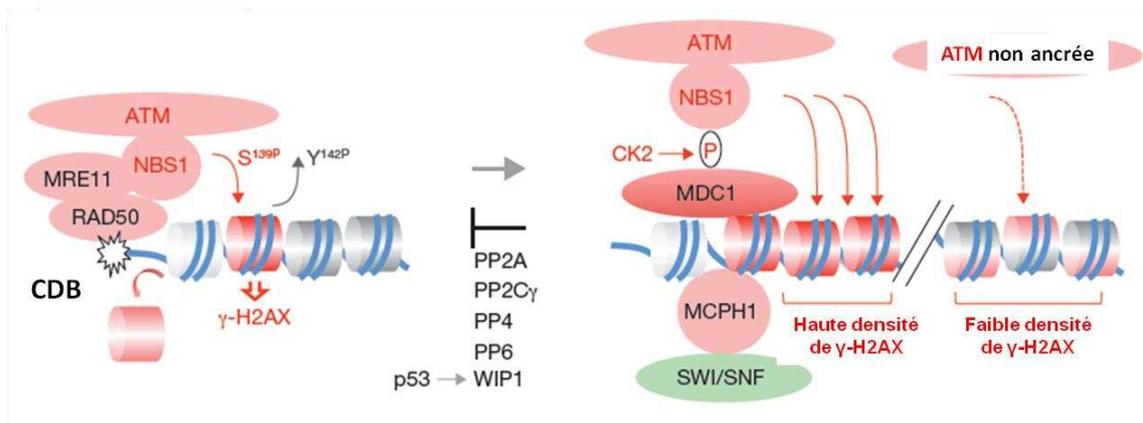


Figure 16. Les réponses de la chromatine à des cassures double-brin de l'ADN (CDB) sont orchestrées par une série de modifications post-traductionnelles. En rouge : phosphorylation, en vert : activité qui altère la condensation de la chromatine. Les activités qui inversent les modifications sont en noir à la transition entre le schéma de gauche et celui de droite (D'après Lukas et coll., 2011).

Les conséquences biologiques de cette succession d'événements ne sont pas encore élucidées mais elles jouent certainement un rôle dans la décondensation de

l'ADN, permettant ainsi le recrutement et l'action des protéines impliquées dans la réparation des CDB (Lukas et al. 2011). De plus, le complexe MRN activé par la kinase ATM est connu pour être impliqué dans les voies de réparation de CDB (van Gent et al. 2001).

4. Cassures double-brin de l'ADN et lésions UV

Lorsque les fourches de réplication sont bloquées par des lésions provoquées par les rayons UV et qu'elles ne sont pas prises en charge, par la TLS par exemple, elles deviennent des structures fragiles et ceci peut conduire à la formation des CDB (Dunkern & Kaina 2002; Limoli et al. 2002; Garinis et al. 2005; Temviriyankul et al. 2012). Par ailleurs, il a été proposé que les régions d'ADNsb au niveau des brèches formées lors de la réplication post-réplivative peuvent également conduire à des CDB si elles ne sont pas comblées (Elvers et al. 2011).

Les mécanismes proposés pour la formation de CDB à partir de régions d'ADNsb induites par la présence de lésions provoquées par les rayons UV sont l'effondrement de ces régions ou l'action d'une endonucléase (Petermann & Helleday 2010; Cleaver 2011).

Les CDB ainsi induites indirectement par l'irradiation UV au niveau des fourches de réplication ainsi qu'au niveau des brèches d'ADNsb peuvent être réparées par RH (Limoli et al. 2005; Elvers et al. 2011; Eppink et al. 2011). De façon intéressante, la formation de CDB à partir d'une fourche de réplication bloquée ne peut avoir lieu par la voie NHEJ car dans ce cas, la cassure n'a qu'une seule extrémité.

Néanmoins, il a également été proposé que les CDB induites par le blocage prolongé des fourches de réplication par les lésions UV sont cytotoxiques (Temviriyankul et al. 2012) et même qu'elles sont à l'origine de l'induction de l'apoptose induite par les UV dans les cellules de mammifères (Dunkern & Kaina 2002; Batista et al. 2009).

5. Cassures double-brin de l'ADN et la doxorubicine

Par ailleurs, certaines drogues chimiothérapeutiques, comme la doxorubicine, induisent des CDB de l'ADN. La doxorubicine est un antibiotique de type anthracycline couramment utilisé pour le traitement de cancers, comme les cancers du sein (Hurley 2002).

Cet agent génotoxique agit sur la topoisomérase II (Topo-II) (Yue et al. 2012). La Topo-II est impliquée dans le relâchement de l'ADN via la formation de CDB, l'introduction de supertours négatifs puis ligature par une ligase. La doxorubicine est capable de s'intercaler dans l'ADN et de se lier de façon covalente à cette molécule après le double clivage par la Topo-II, structure appelée complexe de clivage. Ceci stabilise le complexe de clivage et empêche ainsi la ligature des deux cassures simple-brin (CSB) (Zunino & Capranico 1990; Hurley 2002). Lorsque cette structure bloque la progression des fourches de réplication et la transcription elle conduit à la formation de CDB (Figure 17) (Hurley 2002, Yue et al. 2012).

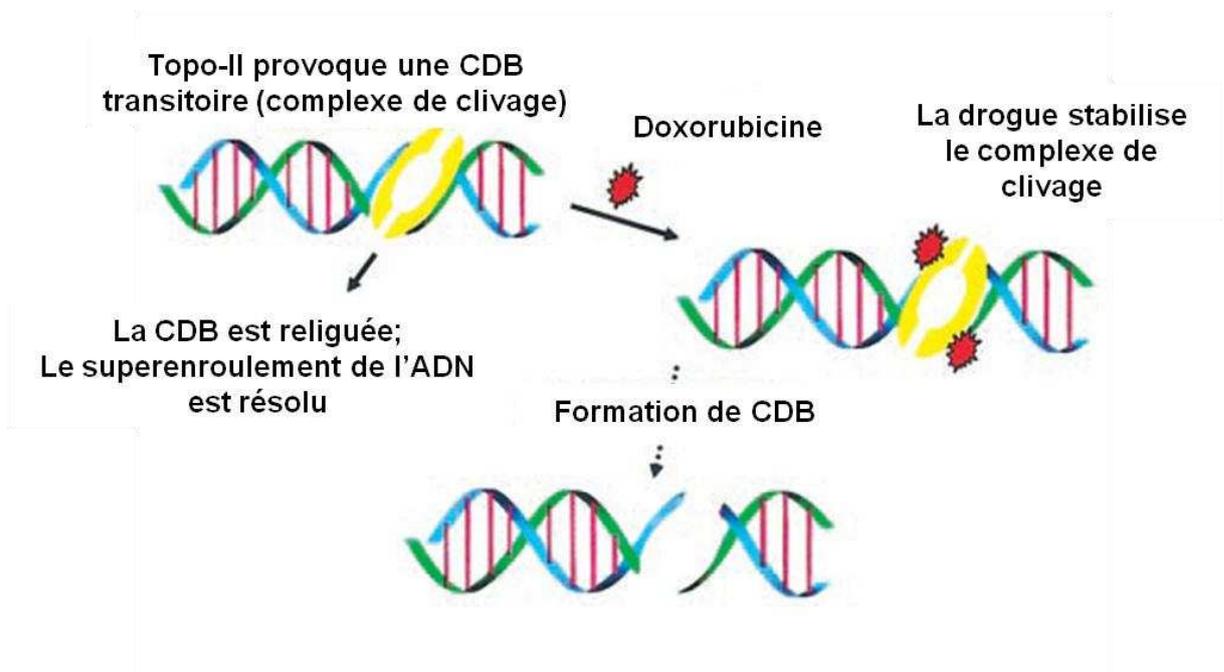


Figure 17. Mode d'action de l'inhibiteur de la topoisomérase II (Topo-II), doxorubicine. Normalement, la Topo-II provoque une CDB transitoire, insère des supertours négatifs et religue la CDB afin de réduire le superenroulement de l'ADN (à gauche). En présence de la doxorubicine, le complexe de clivage est stabilisé, ce qui empêche sa religature. Après la rencontre de ce complexe stabilisé avec des fourches de réplication ou l'ARN polymérase, cela conduit à la formation définitive de CDB (Adapté de Willmore et al. 2004).

La protéine DNA-PK, cruciale pour la voie de réparation de CDB NHEJ (Figure 14), joue un rôle particulièrement important dans la réparation de CDB induites par des inhibiteurs de la Topo-II. En effet, elle peut être impliquée dans la résistance de cellules cancéreuses à l'induction de l'apoptose par des inhibiteurs de la Topo-II (Willmore et al. 2004) et en particulier de la doxorubicine (Friesen et al. 2008).

Bien que l'inhibition de la Topo-II par la doxorubicine soit le mode d'action le mieux connu de cette drogue chimiothérapeutique, elle induit également des dommages oxydatifs sur l'ADN (Keizer et al. 1990). La doxorubicine est en fait un agent intercalant de l'ADN non spécifique de la Topo-II et peut par conséquent provoquer des pontages inter-brins ainsi que des adduits de l'ADN (Hurley 2002, Swift et al. 2006).

6. Apoptose

Le principe de l'utilisation de drogues chimiothérapeutiques est l'induction d'une quantité importante de lésions au niveau de l'ADN des cellules cancéreuses afin d'induire leur mort cellulaire programmée, l'apoptose. De la même façon, lorsqu'une cellule normale d'un organisme présente un excès de lésions, elle est conduite vers la voie apoptotique afin d'éviter qu'elle accumule des mutations et devienne ainsi une cellule cancéreuse.

L'apoptose est considérée une mort régulée, programmée, en opposition à la nécrose qui peut impliquer un groupe de cellules ou même un tissu dont les membranes plasmiques sont lysées, libérant ainsi le contenu intracellulaire dans le milieu, ce qui peut activer une réponse inflammatoire. L'apoptose implique de façon schématique des cellules isolées dont la chromatine nucléaire est compactée et marginalisée avant d'être fragmentée. Le cytoplasme se condense et les éléments du noyau (ADN fragmenté) et du cytoplasme sont protégés par une enveloppe membranaire issue de la convolution des membranes cytoplasmique et nucléaire, constituant ainsi les corps apoptotiques. Ceux-ci sont ensuite phagocytés par des macrophages. L'intégrité des membranes étant conservée au cours du processus apoptotique, il n'y a pas de réaction inflammatoire. Il existe deux voies d'activation de l'apoptose, la voie extrinsèque qui implique des récepteurs membranaires et la voie intrinsèque qui met en jeu la mitochondrie. Les dommages de l'ADN activent en particulier la voie intrinsèque (Hengartner 2000, Pustisek & Situm 2011).

Les différentes étapes de la voie de l'apoptose sont médiées par des caspases, qui sont des protéases à cystéine, activées de façon spécifique au cours l'apoptose. Ces protéases clivent d'autres protéines au niveau de résidus juste après un résidu aspartate. La spécificité des caspases est due à la séquence des 4 résidus à l'extrémité aminoterminal du site de clivage. Le clivage par des caspases peut être à l'origine de l'activation de protéines. D'ailleurs les propres caspases sont en réalité des enzymes zymogènes et sont activées suite à leur clivage par une autre caspase. La voie de

l'apoptose est donc médiée par une cascade d'activation de caspases (Martin et al. 2012). Une autre enzyme caractéristique de l'apoptose dont l'activation dépend de caspases est la DNase responsable du clivage de l'ADN entre nucléosomes au cours de l'apoptose, la CAD (de l'anglais, caspase-activated DNase) (Hengartner 2000, Widlak & Garrard 2009).

Tous les processus impliqués dans la voie de l'apoptose sont régulés par des caspases et par conséquent, l'inhibition de ces protéines, qu'elle soit par ARN interférence ou par des inhibiteurs de caspases, conduit à la suppression de l'apoptose (Hengartner 2000, Carvalho et al. 2010).

Objectifs de la thèse

L'objectif principal de mon travail de thèse était d'étudier l'implication de l'ADN polymérase η (Pol η) dans des cellules déficientes en réparation par excision de nucléotides exposées à une faible dose d'UVC.

Tout d'abord, je me suis intéressée à la réponse aux dommages de cellules déficientes en NER irradiées à faible dose d'UVC. En effet, mon objectif était d'évaluer les conséquences moléculaires et cellulaires de la persistance des lésions UV dans le génome mais sans qu'elles soient cytotoxiques. Nous avons vu que les principaux types de lésions de l'ADN provoqués par les rayons UV sont les CPD et les 6-4PP. Bien que les CPD soient formés en plus grande quantité que les 6-4PP, ceux-ci provoquent une déformation beaucoup plus prononcée que les CPD. Ceci a principalement deux conséquences : les 6-4PP sont plus rapidement détectés par la machinerie de réparation et sont ainsi éliminés en 3-4 heures après l'irradiation ; par contre s'ils persistent ils seront plus difficilement tolérés que les CPD. Mon premier objectif était d'évaluer les effets de la persistance des lésions UV provoquées par une faible dose d'UVC sur la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire et formation de γ H2AX lorsque la cellule est capable de survivre. Ainsi nous avons choisi de travailler avec des cellules déficientes uniquement en GGR, les cellules XP-C. Elles présentent l'avantage d'être incapables de réparer les lésions présentes dans l'ADN non codant, et par conséquent la grande majorité des lésions, et de ne pas être extrêmement sensibles à l'irradiation UV, comme les cellules XP-A par exemple. Les cellules XP-C représentent donc un bon modèle cellulaire pour étudier les réponses aux dommages de l'ADN provoqués par les rayons UV.

Dans un deuxième temps, je me suis intéressée à l'implication de Pol η dans la survie des cellules XP-C. En effet, dans une cellule où la NER est fonctionnelle, nous avons vu que l'absence de Pol η ne conduit qu'à une légère sensibilisation des cellules. Dans ce cas, les 6-4PP sont rapidement réparés par la NER et les CPD, plus lentement réparés par la NER, sont répliqués par l'action de concert d'autres polymérases de translésion. Par ailleurs, si l'implication de Pol η dans la tolérance des CPD est établie, elle reste controversée pour les 6-4PP. En effet, nous avons vu que différentes études ont montré que Pol η est capable d'insérer le premier nucléotide face à un 6-4PP et jouer ainsi le rôle de Pol d'insertion au niveau de la réplication de ces lésions. Par contre, un travail récent sur des fibroblastes embryonnaires de souris a proposé que le rôle de Pol η se limite principalement à la réplication des CPDs et n'est pas impliqué dans celui des 6-4PP présents dans le génome. Par conséquent, l'implication de Pol η dans la tolérance des 6-4PP présents dans le génome est encore controversée. Afin d'évaluer la contribution de Pol η dans la prise en charge des 6-4PP dans le génome de cellules humaines, nous avons décidé d'établir un modèle de fibroblastes humains déficients à la fois en XPC et Pol η . Plus précisément, l'expression du gène XPV codant Pol η serait réduite de façon stable par des vecteurs dérivés du virus d'Epstein-Barr portant une séquence de shRNA spécifique dans les cellules XP-C utilisées dans la première partie de l'étude. L'extinction de Pol η devrait être validée d'un point de vue fonctionnel. A partir de ce modèle, mon objectif était d'évaluer l'effet de l'absence de Pol η dans la prolifération, cycle cellulaire et formation de γ H2AX ainsi que de cassures de l'ADN dans les cellules XP-C irradiées à faible dose d'UVC.

Par ailleurs, les protéines impliquées dans la NER et Pol η prennent en charge différents types de dommages, autres que ceux provoqués par les rayons UV, comme ceux induits par des drogues chimiothérapeutiques. Nous nous sommes intéressés en particulier à l'intervention des protéines Pol η et XPA dans la réponse aux dommages induits par la doxorubicine. Plus précisément, nous voudrions savoir si l'absence de ces protéines aurait une conséquence au niveau de la prolifération, du cycle cellulaire, de la formation de γ H2AX ainsi que de l'induction de l'apoptose et de la nécrose dans les cellules humaines traitées avec des doses cliniques de doxorubicine.

Matériel et Méthodes

I. Lignées et culture cellulaire

J'ai utilisé des fibroblastes humains transformés par l'antigène T du virus simien 40 (SV40) XP4PA (Daya-Grosjean et al. 1987) et XP30RO (Cleaver 1989) issus de biopsies de peau de patients atteints respectivement de XP du groupe C et V. Ces fibroblastes seront nommés respectivement cellules XP-C et XP-V tout au long de ce manuscrit. Les fibroblastes MRC5-SV (Jacobs et al. 1970) issus de poumon fœtal humain et des cellules XP4PA dont la mutation du gène XPC a été corrigée par recombinaison homologue (cellules XP-C⁺) ont été utilisés comme témoin.

Les cellules ont été cultivées à 37°C en incubateur dans une atmosphère CO₂ à 5%, en milieu essentiel minimum d'Eagle de Dulbecco (DMEM, LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brésil) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Cultilab, Campinas, SP, Brésil), 0,1 mg/mL de pénicilline, 0,1 mg/mL de streptomycine, 0,25 mg/mL d'amphotéricine B (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) et 8 µg/mL de tylosin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

L'expression du gène POLH a été réprimée via l'utilisation de vecteurs dérivés du virus d'Epstein Barr (pEBV) portant des séquences de shRNA (short hairpin RNA) et le gène de résistance à l'hygromycine B (Biard et al. 2005; Biard 2007). Nous avons utilisé deux vecteurs pEBV portant une séquence de shRNA dirigée contre l'ARN messenger (ARNm) codant l'ADN polymérase η (Polη). Le vecteur pEBV BD1045 porte un shRNA qui cible le cadre ouvert de lecture (en anglais, open reading frame, ORF) de l'ARNm de Polη alors que le vecteur pEBV BD1047 cible la région non traduite en 3' de cet ARNm (en anglais, 3' untranslated region, 3'UTR) (Bétous et al. 2009; Rey et al. 2009). Les fibroblastes XP-C ont été transfectés avec l'agent transfectant FuGENE HD (Promega, Madison, WI, USA). Les populations et les clones contenant les vecteurs ont été sélectionnés avec 125 µg/ml d'hygromycine B (Invitrogen, Life Technologies) et ils ont été maintenus en culture en présence de cet antibiotique. Le clone pour lequel la répression de l'expression de Polη a été la plus efficace a été choisi pour la suite de l'étude et nous l'avons nommé « XP-C/Polη^{KD} ». En parallèle, les fibroblastes XP-C et XP-C⁺ ont été transfectés avec un vecteur pEBV contrôle (shCTL) portant une séquence de shRNA avec deux mésappariements. Les populations transfectées de façon stable ont été sélectionnées puis maintenues en présence d'hygromycine B. Toutes les expériences avec les cellules XP-C/Polη^{KD} ont été réalisées avec les cellules contrôle XP-C shCTL et XP-C⁺ shCTL.

II. Traitements

Les cellules en croissance exponentielle ont étéensemencées 16 heures avant l'irradiation. Pour l'irradiation aux UVC, les cellules sont lavées au PBS (de l'anglais, phosphate buffered saline) incubé préalablement à 37°C puis exposées à un irradiateur UVC (254 nm). A partir de la puissance de la lampe UVC mesurée par un radiomètre VLX 254 (exprimée en mW.cm^{-2}), nous calculons le flux exprimé en $\text{J.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. L'exposition pendant différents temps correspond à des irradiations à diverses doses d'UVC. J'ai travaillé avec un flux de $0,1 \text{ J.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Après l'irradiation, les cellules ont reçu du milieu DMEM complet frais avant d'être remises à l'étuve pendant différents temps de récupération.

Lorsque les cellules ont été exposées à la fois aux rayons UVC et à la caféine (Sigma-Aldrich), du milieu complet frais avec caféine à une concentration finale de 1 mM a été ajouté aux cellules immédiatement après leur irradiation. La caféine a été préparée dans du PBS à partir d'une solution stock de 77,2 mM, gardée à température ambiante après avoir été filtrée pour des conditions stériles.

III. Prolifération cellulaire

Toutes les lignées cellulaires ont étéensemencées à une densité de 5.10^4 cellules par puits de plaques 6-puits, sauf les cellules XP-C/Pol η^{KD} qui ont étéensemencées à 10^5 cellules par puits. Les cellules ont été incubées pendant 72 heures après 0, 2, 5 et 10 J/m^2 de rayons UVC et comptées à l'aide d'un compteur de cellules et particules (Z1 Coulter Particle Counter, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), après avoir été soigneusement lavées au PBS. La prolifération cellulaire a été exprimée en pourcentage du contrôle non irradié.

La prolifération cellulaire en absence de traitement a été suivie en temps réel grâce à un système appelé xCELLigence system (Roche, Basel, Switzerland). Les cellules XP-C et XP-C/Pol η^{KD} ont étéensemencées à 3500 cellules par puits dans une plaque de 96 puits contenant des microélectrodes (E-Plate, Roche). L'impédance de chaque puits a été ainsi mesurée toutes les heures pendant 96 heures après l'ensemencement. A partir de la valeur de l'impédance, le logiciel détermine l'index cellulaire qui est directement proportionnel au nombre de cellules adhérees par puits.

Afin d'évaluer la sensibilité des cellules aux rayons UVC et à la caféine, les cellules ont étéensemencées à 2.10^4 cellules par puits de plaques 12-puits et leur prolifération 72 heures après l'irradiation en présence ou en absence de caféine a été

déterminée grâce au test colorimétrique XTT (Cell Proliferation Kit II, XTT, Roche) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 400 μ L de solution XTT ont été mises en contact avec les cellules pendant 2 heures à 37°C. Cette solution change de couleur en fonction de l'activité mitochondriale et, par conséquent, selon le nombre de cellules viables. L'absorbance a été mesurée à 492 et 650 nm et les résultats finaux correspondent à la différence entre ces deux mesures. La prolifération cellulaire a été exprimée en pourcentage du contrôle non irradié.

IV. Immunofluorescence

Dans des plaques 6 puits, 8.10^4 cellules par puits ont étéensemencées sur des lamelles stériles. Différents temps après l'irradiation, les cellules ont été lavées au PBS puis fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes. Les cellules ont ensuite été perméabilisées pendant 10 minutes dans du tampon Triton (0,5% de Triton X-100, 20 mM de Hepes KOH, pH 7,9, 50 mM de NaCl, 3 mM de $MgCl_2$ et 300 mM de sucrose). Les cellules ont été incubées dans la solution d'hybridation BSA-T (3% de BSA, bovine sérum albumine, 0,05% de Tween-20, Sigma-Aldrich) avant d'être hybridées à température ambiante avec un anticorps primaire anti- γ H2AX (Millipore, Billerica, MA, USA) dilué au $1/10000^{ème}$ dans du BSA-T pendant 2 heures. Après plusieurs lavages au BSA-T, les cellules ont été hybridées avec un anticorps secondaire Alexa Fluor (Invitrogen) de chèvre anti-souris couplé à une molécule fluorescente, Texas Red (TxR, 594 nm, rouge) dilué au $1/1000^{ème}$ pendant 1 heure dans le noir. Les lamelles ont été fixées sur des lames à l'aide d'une solution de montage (Vectashield mounting medium, Vector laboratories) contenant un intercalant fluorescent bleu de l'ADN, le 4',6' di amidino Phenyl Indole (DAPI). Les lames ont été ainsi conservées à 4°C pendant la première nuit, puis à -20°C.

Les cellules ont été observées grâce au microscope Zeiss Axio Imager ZI à l'objectif à immersion dans l'huile 100x et prises en photo par une caméra digitale. Pour chaque expérience, près de 100 cellules ont été observées par lame. Chaque point clairement distinguable est considéré comme un foyer, structure formée par le recrutement et accumulation de protéines à un site donné (Misteli & Soutoglou 2009). Les cellules contenant plus de quinze foyers γ H2AX ont été considérées positives pour cette histone phosphorylée étant donné que même en absence de traitement, les cellules normales et déficientes présentent une dizaine de foyers γ H2AX.

Pour les irradiations locales, des filtres contenant des micropores de 5µm de diamètre (Millipore) ont été placés sur les lamelles à travers lesquels les cellules ont été irradiées. Des filtres ont également été placés pour les contrôles non irradiés. Pour le marquage des lésions provoquées par les rayons UVC, 6-4PPs et CPDs, le protocole suivi a été le même que pour le marquage γ H2AX avec une étape supplémentaire de dénaturation de l'ADN avec 2M de HCL (acide chloridrique) pendant 10 minutes à 37°C avant l'hybridation avec les anticorps primaires dirigés contre ces dommages. Pour le marquage de cellules en réplication, nous avons introduit 3µM de BrdU (Bromodeoxyuridine, analogue de la thymine, Sigma-Aldrich) dans le milieu immédiatement après l'irradiation locale. Puis nous avons procédé à l'immunomarquage des cellules en phase S avec un anticorps anti-BrdU comme décrit ci-dessus. Les anticorps utilisés pour les irradiations locales ont été les suivants : anti-CPD and anti-6-4PP de souris (Cosmo Bio Co., Ltd, Tokyo, Japan) dilués au 1/200ème, anti- γ H2AX de lapin (ab-2893 Abcam, Cambridge, MA, USA) au 1/100ème, anti-BrdU de souris (Dako, Danemark) et anti-RPA p34 de souris (Neomarkers, Fremont, CA, USA) au 1/2000ème.

V. Cytométrie en flux (analyses de cycle cellulaire, γ H2AX et SubG1)

Les cellules ont étéensemencées à $1,5 \cdot 10^5$ cellules par plaque de 60 mm. Différents temps après traitement, les cellules adhérentes ont été détachées par l'action de la trypsine et ajoutées aux cellules mourantes détachées présentes dans le milieu de culture. Les cellules ont été fixées avec 1% de formaldéhyde sur glace, lavées au PBS, resuspendues dans une solution glaciale de 70% d'éthanol et gardées à -20°C pendant au moins 24 heures. Après une étape de blocage et de perméabilisation avec le tampon BSA-Triton (0,2% de Triton X-100, 1% de BSA dans du PBS), les échantillons ont été incubés avec l'anticorps primaire anti- γ H2AX de souris (Millipore) dilué au 1/500^{ème} pendant une nuit à 4°C. Les cellules ont été lavées deux fois au tampon BSA-Triton puis incubées avec un anticorps secondaire (Sigma-Aldrich) anti-souris FITC (fluorescein iso-thiocyanate) dilué au 1/200^{ème} pendant 1 heure à température ambiante dans le noir. Après deux lavages, l'ADN a été marqué avec 20 µg/mL d'iodure de propidium (PI), 200 µg/mL de RNase A (Invitrogen) et 0,1% de Triton X-100 dans du PBS pendant 40 minutes à température ambiante.

Pour l'analyse du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN en particulier, les cellules ont été traitées, incubées pendant les temps indiqués et marquées avec 10 µM

de BrdU pendant 20 minutes avant la collecte des cellules. Les cellules ont alors été détachées par la trypsine, lavées deux fois au PBS, fixées avec 75% d'éthanol glacial puis gardées à -20°C pendant au moins une nuit. La veille de l'acquisition des données, les échantillons ont été incubés avec pepsine (14 µM, 250 U/mg, 1,5% HCl 2 M dans l'eau, Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes à 37°C puis avec HCl 2M pendant encore 20 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS puis perméabilisées avec le tampon Bu (0,5% de SVF, 0,5% de Tween-20, 20 mM de Hepes dans du PBS), avant l'incubation avec l'anticorps anti-BrdU (Dako) dilué au 1/100^{ème} pendant 1 heure. Les échantillons ont ensuite été lavés puis incubés pendant 30 minutes avec l'anticorps secondaire anti-souris FITC au 1/200^{ème}. Enfin, l'ADN a été marqué avec PI comme décrit ci-dessus.

L'acquisition des données a été faite par Guava Flow Cytometer et les analyses ont été effectuées avec le logiciel CytoSoft Data Acquisition and Analysis Software (Millipore). Au moins 5000 cellules ont été comptées par échantillon.

VI. Western Blot

Les culots de cellules ont été obtenus après trypsinisation des cellules, centrifugation pendant 1 minute à 10 000 rpm, à 4°C et un lavage au PBS froid. Ils ont ensuite été resuspendus dans un volume de tampon de lyse (50 mM de Tris pH 7,5, 20 mM de NaCl, 1 de mM MgCl₂, 0,1% SDS, anti-protéases (Cocktail Set III, Calbiochem, Merck, White House Station, NJ, USA) auquel une nucléase, la benzonase (Novagen, Merck) a été ajoutée pour une concentration finale de 0,25 U/µL juste avant son utilisation. Les cellules ont ainsi été lysées pendant 20 minutes à 4°C puis centrifugées pendant 10 minutes à 13000 rpm à 4°C. Les surnageants contenant les protéines extraites ont été gardés et des aliquotes de chaque échantillon ont été utilisées pour la quantification de la concentration en protéines par Bradford. Les protéines ont été dénaturées pendant 10 minutes à 90°C avec du tampon Laemmli 4X (187,5 mM de Tris-HCl, 125 mM de DTT, 6% de SDS, 30% de glycérol et 0,03% de bromophénol blue). L'équivalent de 20 µg de protéines par échantillon ont été séparés par sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Après transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA), et son blocage avec une solution de lait 5%, les membranes ont été hybridées avec des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt : anti-Pol η (ab-17725 Abcam), anti-XPC (ab-6264 Abcam) et anti-GAPDH (sc-32233 Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA).

VII. Test des comètes en conditions alcalines et neutres

Afin de détecter des cassures de l'ADN (conditions alcalines), 10^5 cellules ont étéensemencées dans des plaques de 35 mm. Juste après ou 24 heures après le traitement, les cellules ont été détachées par la trypsine et resuspendues dans 180 μ L d'agarose à un point faible de fusion (en anglais low melting point, LMP) à 37 °C. Les cellules ont alors été étalées de façon homogène sur deux lames de microscope recouvertes avec 1,5% de gel d'agarose et puis immédiatement couvertes avec des lamelles. Afin de solidifier l'agarose LMP, les lames ont été placées à 4°C pendant 10 minutes. Après avoir retiré soigneusement les lamelles, les cellules ont été lysées pendant une nuit à 4°C dans une solution de lyse (2,5 M de NaCl, 100 mM d'EDTA, 10 mM de Tris, puis 1% de Triton X-100 et 10% de dimethyl sulfoxyde, DMSO, pH 10 ajoutés juste avant son utilisation). Les lames ont ensuite été placées horizontalement dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon alcalin froid (300 mM de NaOH, 1 mM d'EDTA, pH > 13) pendant 25 minutes. L'électrophorèse a été réalisée pendant 25 minutes à 25 V et 300 mA. Pour la détection uniquement des cassures double-brin de l'ADN par le test des comètes en conditions neutres, après la lyse pendant la nuit, les lames ont été lavées trois fois avec un tampon neutre froid d'électrophorèse (300 mM d'acétate de sodium, 100 mM de Tris, pH 8,5 ajusté avec de l'acide acétique). Les lames ont été placées pendant 1 heure horizontalement dans ce tampon neutre avant l'électrophorèse pendant encore 1 heure à 14 V et 12 mA. Ensuite, dans les deux conditions, alcalines et neutres, les lames ont été neutralisées avec trois lavages de 5 minutes avec un tampon de neutralisation (0,4 M de Tris, pH 7,5) puis fixées avec éthanol 100% glacial. Les lames ont été marquées avec un intercalant de l'ADN le bromure d'éthidium et observées au microscope à fluorescence (Axiovert 200, Zeiss). Au moins 100 comètes par lame ont été analysées avec le logiciel Comet Assay IV software (Perceptive instruments). Les corps apoptotiques n'ont pas été pris en compte.

VIII. Statistiques

Les différences statistiquement significatives ont été évaluées par test t ou two-way ANOVA suivie du test de Bonferroni par le logiciel Prism 5 (GraphPad Software Inc., CA, USA).

RÉSULTATS

I) L'ADN polymérase η est cruciale pour la survie des cellules humaines XP-C irradiées à une faible dose d'UVC

1. Étude des réponses aux lésions provoquées par les rayons UVC dans des cellules humaines XP-C

Mon objectif était d'étudier les réponses cellulaires et moléculaires aux lésions de l'ADN induites par les rayons UV dans des cellules humaines. Étant donné que, dans un contexte où la NER est fonctionnelle, les 6-4PP sont rapidement éliminés, nous avons décidé d'utiliser des cellules déficientes en réparation du génome global (GGR). Mon étude concerne donc les réponses de la cellule à la persistance dans le génome des deux lésions majeures induites par les rayons UVC, les CPD et les 6-4PP.

1.1. Conséquences d'une irradiation à faible dose d'UVC sur la prolifération, le cycle cellulaire et la fragmentation de l'ADN des cellules XP-C

Tout au long de mon travail, j'ai utilisé les fibroblastes humains transformés par le virus simien 40 (SV40) : les cellules XP-C déficientes en GGR et les cellules témoins fonctionnelles en NER (MRC5 et XP-C⁺, NER+) (Figure 18). La première étape de mon travail a été de déterminer la dose d'UVC adéquate pour notre étude, c'est-à-dire la dose qui a un effet sur la prolifération des cellules XP-C mais qui leur permet néanmoins de survivre malgré leur hypersensibilité aux rayons UV.

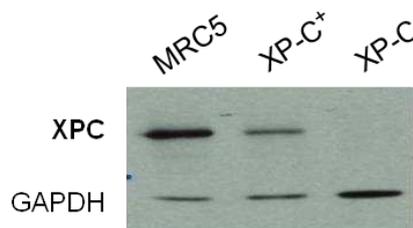


Figure 18. Détection de la protéine XPC endogène par western blot.

Tout d'abord, je me suis intéressée à la prolifération des cellules suite à l'exposition à différentes doses d'UVC (Figure 19). Les lignées NER+ et XP-C ont été irradiées à 2, 5 et 10 J/m² d'UVC et les cellules ont été comptées 72 heures après UV.

La prolifération de chaque type cellulaire après ces expositions est exprimée en pourcentage du contrôle non irradié et représentée dans la Figure 19.

La prolifération de la lignée cellulaire XP-C a été affectée dès 2 J/m² d'irradiation, dose à laquelle les cellules ont néanmoins atteint 65% du contrôle non irradié. L'altération de la multiplication de ces cellules était dose-dépendante et les expositions à 5 et 10 J/m² d'UVC ont réduit la prolifération à respectivement 29% et 16% du contrôle.

Par contre, les cellules NER+ n'ont eu leur taux de prolifération altéré qu'après 10 J/m² (80% du contrôle). J'ai donc obtenu un effet sur la prolifération des cellules XP-C à partir d'une faible dose d'UVC, 2 J/m². A cette dose, les fibroblastes XP-C irradiés réussissent néanmoins à se multiplier jusqu'à 72 heures malgré la présence des lésions (5.10⁴ cellules à t=0, 3.10⁵ cellules 72 h après une irradiation à 2 J/m²). Nous avons donc choisi 2 J/m² pour la suite de notre étude.

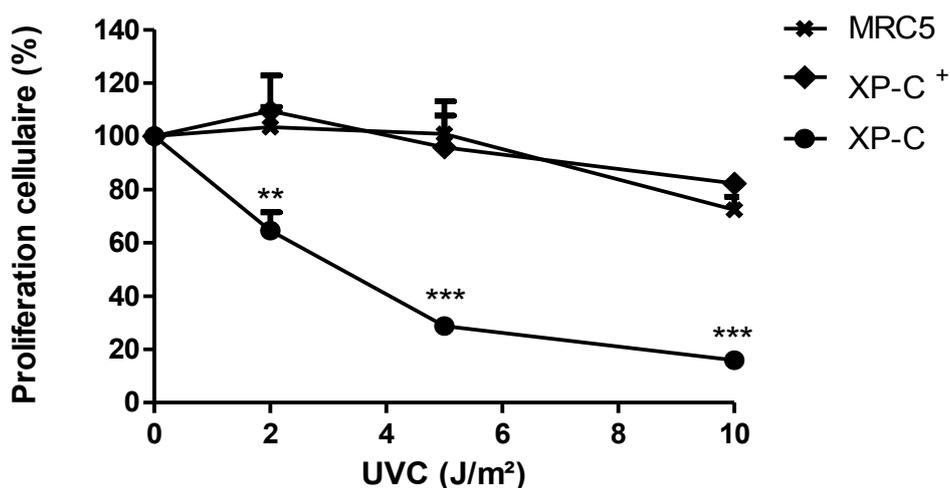


Figure 19. Prolifération des cellules NER+ et XP-C 72 heures après irradiation à différentes doses d'UVC (2, 5 et 10 J/m²). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle non irradié. Chaque point représente la moyenne et les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard d'au moins trois expériences réalisées de façon indépendante. La significativité des différences entre les cellules XP-C et XP-C⁺ est indiquée (**P < 0,01; ***P < 0,001)

Ensuite, je me suis demandée si les cellules XP-C continueraient à proliférer au-delà de 72 heures après 2 J/m² ou si elles seraient bloquées à cause des lésions non réparées. J'ai donc évalué la prolifération des cellules NER+ et XP-C après irradiation à 2 J/m² tous les jours pendant une semaine (Figure 20). En parallèle, la prolifération de ces cellules en absence de traitement a également été suivie. Toutes les lignées cellulaires ont un taux de prolifération comparable, c'est-à-dire environ une division

toutes les 24 heures, bien que les cellules XP-C aient présenté une prolifération légèrement plus rapide. Comme le montre la Figure 20, le ralentissement de la prolifération des fibroblastes XP-C irradiés est détectable à partir de 48 heures après UV alors que les cellules témoins NER+ ne présentent aucune altération de leur prolifération après ce traitement. De plus, entre 72 et 168 heures après irradiation, la prolifération des cellules XP-C reste quasiment constante, environ 60% du contrôle non irradié. Donc, malgré la persistance des lésions non réparées dans leur génome, les cellules XP-C continuent de proliférer plus d'une semaine après traitement.

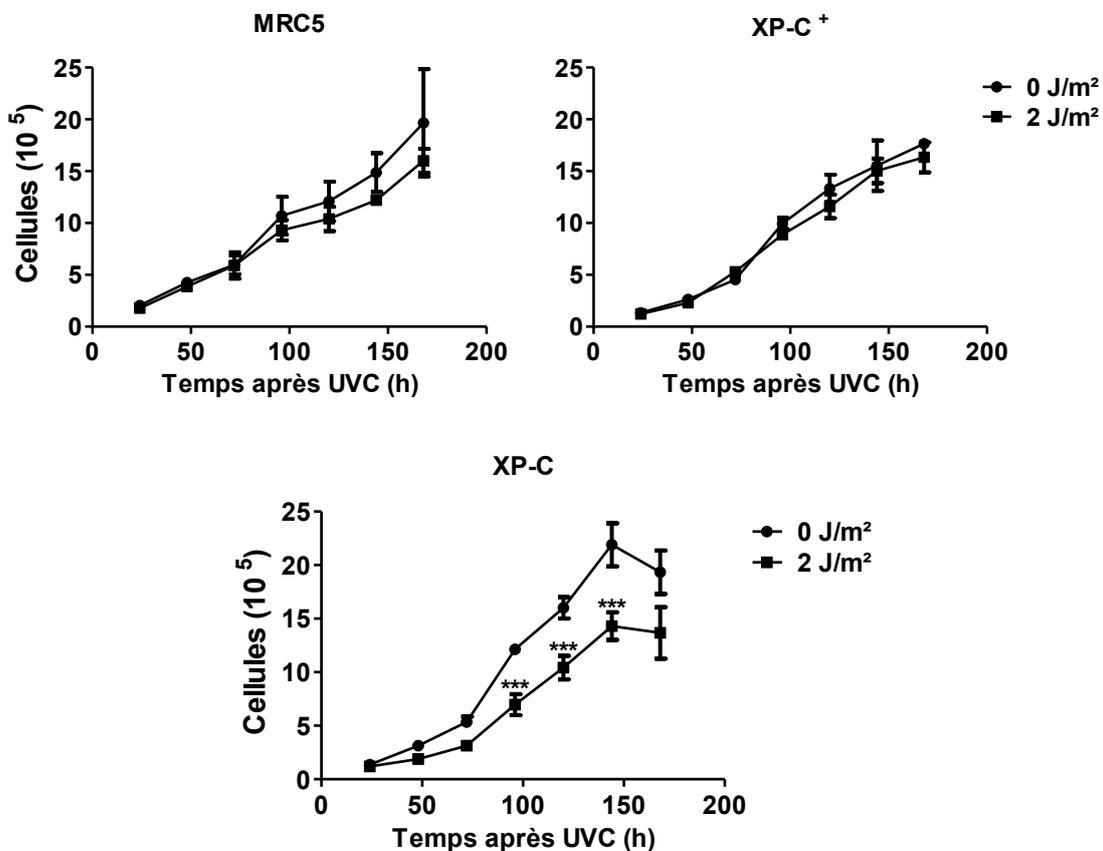


Figure 20. Prolifération des cellules MRC5, XP-C⁺ et XP-C au cours du temps après 0 et 2 J/m² d'UVC. Les cellules ont été comptées 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 h après traitement. Chaque point représente la moyenne et les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard d'au moins trois expériences réalisées de façon indépendante. La significativité des différences entre 0 et 2 J/m² pour les cellules XP-C est montrée (***P < 0,001).

Les fibroblastes XP-C irradiés à 2 J/m² sont donc ralentis à partir de 48 heures après exposition aux UVC par rapport à leur contrôle non irradié. Cependant, ces cellules parviennent à poursuivre leur prolifération. Puisque la seule différence entre les

cellules isogéniques XP-C⁺ et XP-C est la déficience en GGR de ces dernières, il est possible de conclure que ce sont les lésions induites par les UVC, qui sont à l'origine du ralentissement de la prolifération des cellules XP-C.

Ce ralentissement pouvait être le reflet d'un arrêt du cycle cellulaire et /ou de l'induction de mort cellulaire. Pour lever cette ambiguïté, j'ai étudié le cycle cellulaire des cellules XP-C par cytométrie en flux à différents temps après 2 J/m² (Figures 21 à 23).

Les cellules ont été exposées à 2 J/m² puis marquées avec un analogue de la thymine, le BrdU, juste avant la collecte. J'ai ensuite analysé par cytométrie en flux les cellules marquées avec un anticorps anti-BrdU et un intercalant de l'ADN, l'iodure de propidium (PI) qui permet de mesurer le contenu en ADN. Les cellules en phase Gap 2 (G2) sont les cellules qui contiennent le double de quantité d'ADN (4N chromosomes) par rapport aux cellules en Gap 1 (G1, 2N chromosomes). Les cellules positives pour le marquage au BrdU et ayant un contenu en ADN de 2N à 4N chromosomes sont les cellules en phase de synthèse de l'ADN (phase S, réplication de l'ADN) (voir Figure 21). L'analyse des cellules ainsi marquées permet de quantifier précisément le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle. Le marquage des cellules avec le BrdU permet en plus d'évaluer la phase de synthèse de l'ADN de façon très précise. Il est possible de déterminer si les cellules sont bloquées en phase S, lorsque la fraction de cellules traitées ayant incorporé le BrdU est plus importante que celle du contrôle non traité. De plus, en fonction du contenu en ADN (entre 2N et 4N), nous pouvons même déterminer si le blocage a lieu en début, fin ou tout au long de la phase S. Par ailleurs, il est également possible d'évaluer la progression des fourches de réplication. En effet, si l'incorporation de BrdU (en ordonnée) n'est pas maximale, c'est-à-dire au même niveau que celle observée en absence de traitement, alors, les fourches de réplication sont perturbées et ne sont pas capables d'incorporer correctement le BrdU.

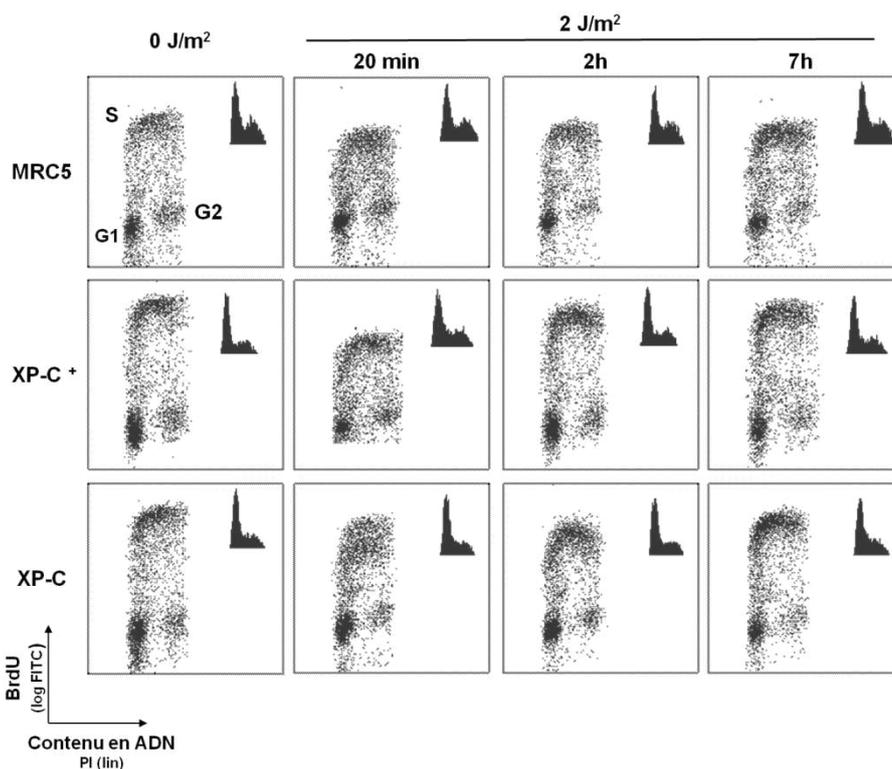


Figure 21. Cycles cellulaires des fibroblastes NER+ et XP-C aux temps courts après l'exposition à 2 J/m². Les graphiques représentent l'incorporation de BrdU, analogue de la thymine en fonction du contenu en ADN. Les trois phases du cycle sont indiquées dans le premier graphique en haut à gauche. Cette expérience a été faite 2 fois et des graphiques représentatifs sont montrés. En haut à droite de chaque graphique, la distribution correspondante des cellules dans les phases du cycle observée uniquement par le marquage du contenu en ADN par PI est indiquée.

La distribution des cellules NER+ et XP-C dans les phases du cycle cellulaire après 2 J/m² a été évaluée à différents temps (Figures 21 à 23). Tout d'abord, j'ai observé qu'en absence de traitement, les cellules XP-C avaient la même distribution que les cellules témoins dans les différentes phases du cycle.

D'après la Figure 21, nous observons une diminution de l'incorporation de BrdU (en ordonnée) 20 minutes après l'exposition aux UVC dans les lignées cellulaires NER+ et XP-C par rapport à leurs contrôles non irradiés, ce qui est en accord avec le fait reconnu que les lésions bloquent la réplication, et donc l'incorporation de BrdU. Dans les cellules XP-C et XP-C⁺, ce ralentissement de la réplication est plus faible 2 heures après UV et, 7 heures après irradiation, l'incorporation de BrdU est comparable à celle des cellules non irradiées. Par ailleurs, d'après la quantification du pourcentage de cellules dans chacune des phases du cycle (Figure 23), les cellules XP-C et XP-C⁺ se sont accumulées en phase S 7 heures après UV. En effet, 64 et 67% respectivement de

cellules XP-C et XP-C⁺ ont été détectées en phase S 7 heures après UV comparés à 49% de cellules en phase S pour les deux lignées en absence de traitement. Donc, en ce qui concerne les temps courts (jusqu'à 7 heures) après l'exposition à 2 J/m², je n'ai pas observé de différence prononcée dans les cycles cellulaires entre les fibroblastes isogéniques XP-C et XP-C⁺. Un résultat similaire a été observé pour les cellules MRC5, bien qu'à 7 heures, la diminution de l'incorporation de BrdU soit encore détectable et l'accumulation de cellules en phase S ne soit pas aussi marquée que celles des cellules XP-C et XP-C⁺ (59% de cellules en phase S 7 heures après traitement par rapport à 49% en absence de traitement). Cette disparité entre les cellules MRC5 par rapport aux lignées XP-C, XP-C⁺ peut être due à la différence de fond génétique.

Cependant, 24 heures après l'irradiation, les cellules MRC5 et XP-C⁺ ont récupéré un cycle cellulaire normal, alors que les cellules XP-C se sont accumulées en phase G2 (24% contre 12% des cellules en G2, 24 heures après UVC et sans traitement respectivement) (Figures 22 et 23). De plus, à ce temps le pourcentage de cellules XP-C en phase S était identique en présence et en absence de traitement avec respectivement, 50 et 48% de cellules en réplication. Donc, en réponse à une irradiation avec 2 J/m² d'UVC, les cellules XP-C se sont arrêtées en phase G2 alors que la réplication de l'ADN avait procédé normalement. Cet arrêt du cycle cellulaire des cellules XP-C était encore détectable 72 heures après l'exposition à 2 J/m² d'UVC, bien que moins important (24% de cellules en G2 à 24 heures et 15% à 72 heures). Il est intéressant de noter que, 24 heures après une dose plus élevée d'UVC (5 J/m²), les cellules XP-C se sont clairement accumulées à la fin de la phase S ainsi qu'en phase G2 (Figure 22).

Par ailleurs, j'ai quantifié le pourcentage de cellules en phase Sub-G1 24, 48 et 72 heures après l'exposition aux UVC (données non montrées) et j'ai constaté que seulement à 72 heures, les fibroblastes XP-C ont présenté une fraction de cellules en Sub-G1. Ceci correspond à des cellules dont le contenu en ADN est inférieur à celui des cellules en G1, et par conséquent à des cellules avec un ADN fragmenté. Cette stratégie est souvent utilisée pour évaluer l'induction d'apoptose (de Lima-Bessa et al. 2008) car, en effet, une des étapes de cette mort programmée consiste dans la fragmentation du matériel génétique. D'après la Figure 23, l'irradiation avec 2 J/m² d'UVC n'a pas induit d'apoptose dans les cellules NER+ 72 heures après, alors que j'ai détecté un faible niveau de fragmentation de l'ADN (8,5% de Sub-G1) dans les cellules XP-C irradiées.

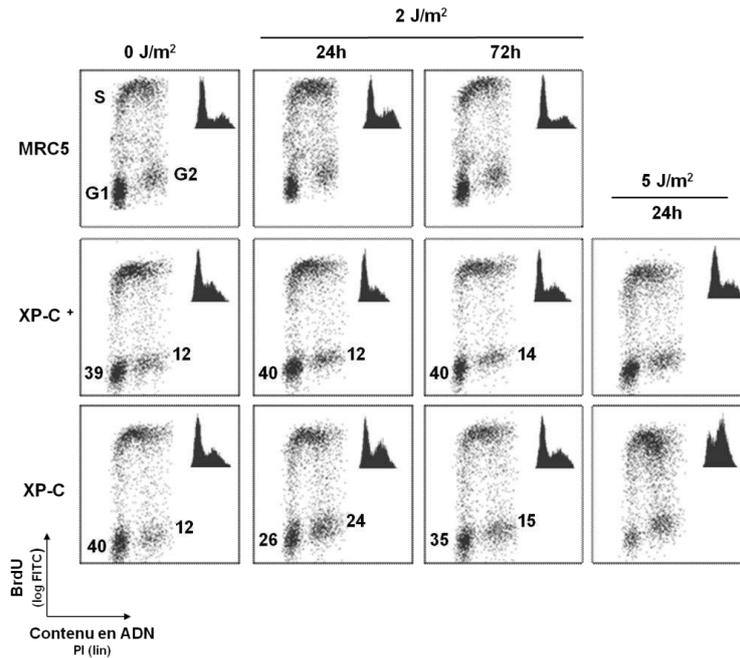


Figure 22. Cycles cellulaires des fibroblastes NER+ et XP-C aux temps longs après l'exposition à 2 J/m². Les graphiques représentent l'incorporation de BrdU en fonction du contenu en ADN. Les trois phases du cycle sont indiquées dans le premier graphique en haut à gauche. Cette expérience a été faite 3 fois individuellement et des graphiques représentatifs sont montrés. En haut à droite de chaque graphique, la distribution correspondante des cellules dans les phases du cycle observée uniquement par le marquage du contenu en ADN par PI est indiquée.

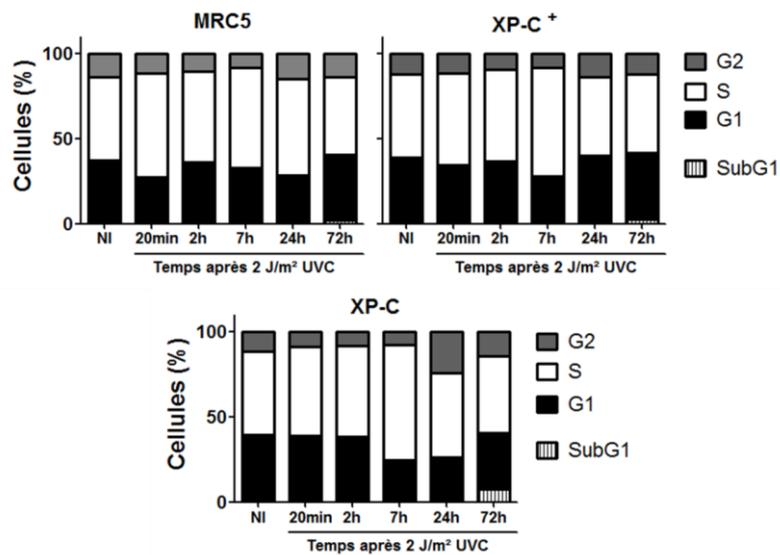


Figure 23. Distribution dans les phases du cycle cellulaire des cellules NER+ et XP-C à différents temps après 2 J/m². Les histogrammes représentent la moyenne des pourcentages de cellules dans chaque phase du cycle obtenus à partir du co-marquage de BrdU et du contenu en ADN réalisé au moins 2 fois de façon indépendante. Le contrôle non irradié (NI) correspondant au temps 24 heures est indiqué. La fraction de cellules en Sub-G1 est indiquée 72 heures après 2 J/m².

L'ensemble de ces résultats indique que, dans les fibroblastes XP-C, l'exposition à 2 J/m² conduit à une diminution de la prolifération de ces cellules. Celle-ci s'explique essentiellement par un arrêt temporaire de leur cycle cellulaire en phase G2, et, dans une moindre mesure, par l'induction de mort cellulaire.

1.2. Etude de la phosphorylation de la serine 139 de l'histone H2AX (formation de γ H2AX) dans les cellules XP-C irradiées aux UVC

L'histone H2AX est phosphorylée au site de la sérine 139, formant γ H2AX, au voisinage de cassures de l'ADN simple-brin (CSB) et des cassures double-brin (CDB) (Rogakou et al. 1998; Rogakou et al. 1999; Vrouwe et al. 2011). La formation de γ H2AX est donc couramment utilisée comme marqueur de ces types de dommages. Cependant, il a été montré que l'irradiation aux UVC induit également la formation de γ H2AX en réponse à la présence d'ADN simple-brin (ADNsb), qu'il soit formé au moment de l'excision du brin endommagé pendant la NER (Marti et al. 2006; Matsumoto et al. 2007), suite à l'incision d'un brin de l'ADN par une endonucléase, comme Ape1 (Vrouwe et al. 2011) ou encore au niveau des fourches de réplication bloquées (Ward & Chen 2001; Limoli et al. 2002; Cleaver 2011). Donc, afin d'approfondir l'étude des effets de l'exposition à une faible dose d'UVC dans des cellules déficientes en GGR, la phosphorylation de H2AX a été étudiée dans des cellules XP-C asynchrones.

1.2.1. Etude de la formation de γ H2AX au niveau des lésions 6-4PPs et CPDs après une irradiation locale aux UVC

Tout d'abord, j'ai cherché à déterminer si la phosphorylation de H2AX se produisait précisément aux sites endommagés par les rayons UVC. Les cellules ont été irradiées à 150 J/m² d'UVC à travers des filtres contenant des micropores (dite irradiation locale) suivie par une analyse en immunofluorescence des lésions 6-4PPs ou CPDs et de γ H2AX. Cette stratégie permet d'observer la formation des lésions au niveau de sites restreints du noyau qui ont été en effet irradiés et d'évaluer ainsi le recrutement ou des modifications post-traductionnelles de protéines à ces sites irradiés. Lorsque les cellules ont été fixées tout de suite après l'irradiation, j'ai pu établir qu'il

n'y avait pas de formation de γ H2AX immédiatement après irradiation dans les cellules NER+ et XP-C, bien que les lésions 6-4PPs et CPDs étaient déjà détectables (Figure 24). Par contre, 2 heures après l'irradiation à 150 J/m² d'UVC, plus de 80% des lésions 6-4PPs et CPDs ont co-localisé avec γ H2AX dans toutes les lignées cellulaires. À 7 heures post exposition aux UVC, les lignées compétentes en NER ne présentaient plus de lésion 6-4PP, en accord avec la rapide réparation de ces photoproduits alors que 70% des CPDs ont co-localisé avec γ H2AX. Néanmoins, dans les cellules XP-C, la quasi-totalité des lésions, à la fois 6-4PPs et CPDs, ont co-localisé avec γ H2AX (Figure 24).

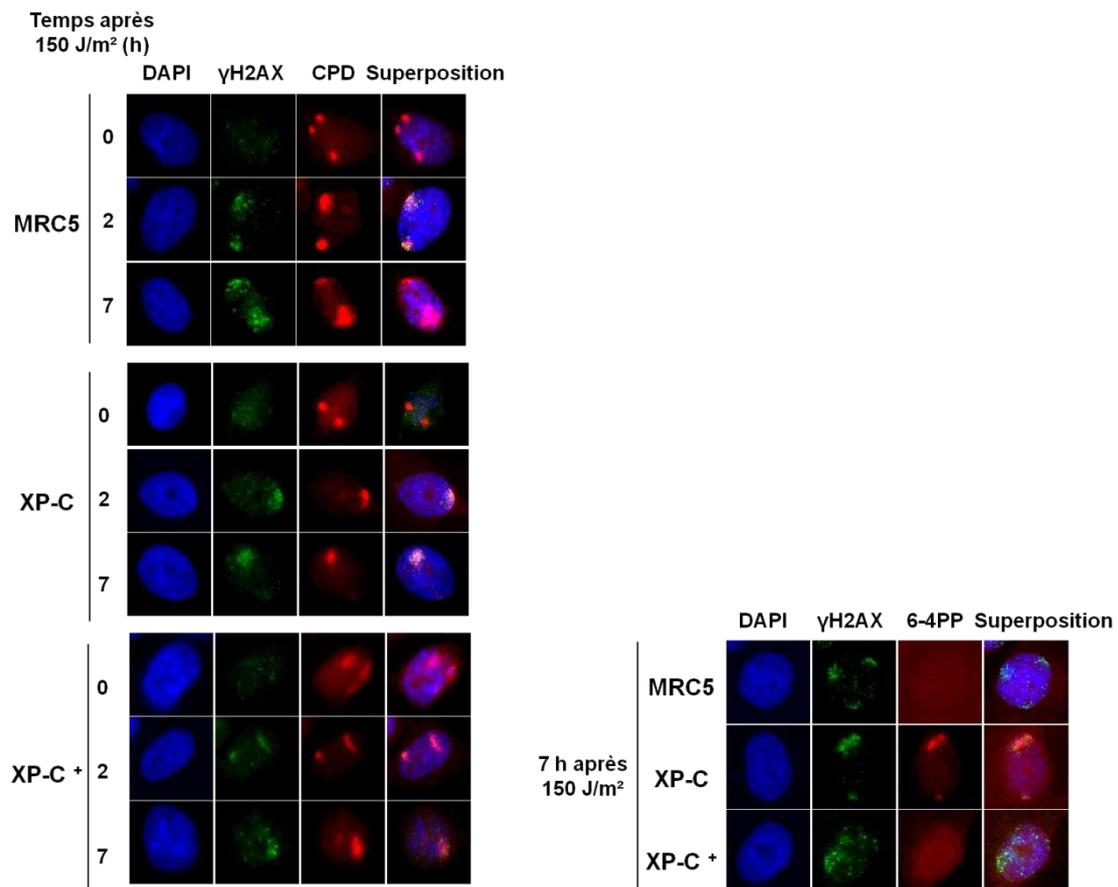


Figure 24. Co-localisation de γ H2AX avec les photoproduits CPD et 6-4PP aux sites irradiés localement avec 150 J/m² d'UVC. Les cellules NER+ et XP-C ont été irradiées à travers des filtres contenant des micropores et les formations de γ H2AX et des CPD (à gauche) et des 6-4PP (à droite) ont été observées par immunofluorescence aux temps indiqués. Les photos sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes.

Nous pouvons ainsi conclure que (i) γ H2AX n'est pas un marqueur direct de photoproduits puisqu'il n'y a pas de marquage sous l'action directe des rayons UV, mais (ii) la phosphorylation de H2AX est induite en réponse à la présence de CPDs et 6-4PPs dans le génome.

1.2.2. Etude de la formation de γ H2AX en réponse à une faible dose d'UVC

Afin d'évaluer la phosphorylation de l'histone H2AX après irradiation à faible dose d'UVC, les fibroblastes MRC5 et XP-C ont été irradiés à 2 J/m^2 d'UVC et la forme phosphorylée de H2AX a été marquée par immunofluorescence. A la différence du marquage de γ H2AX après irradiation locale (Figure 24), en réponse à une irradiation dite globale, c'est-à-dire sans l'utilisation des filtres, le marquage de γ H2AX est observé sous la forme de points dans tout le noyau (Figure 25). Et, chaque point clairement distinguable est considéré comme un foyer, structure formée par le recrutement et accumulation de protéines à un site donné (Misteli & Soutoglou 2009). Etant donné que les fibroblastes transformés par le virus SV40 ont des foyers γ H2AX en condition basale, seuls les noyaux présentant plus de 15 foyers γ H2AX ont été considérés comme positifs pour le marquage de γ H2AX (Figure 25).

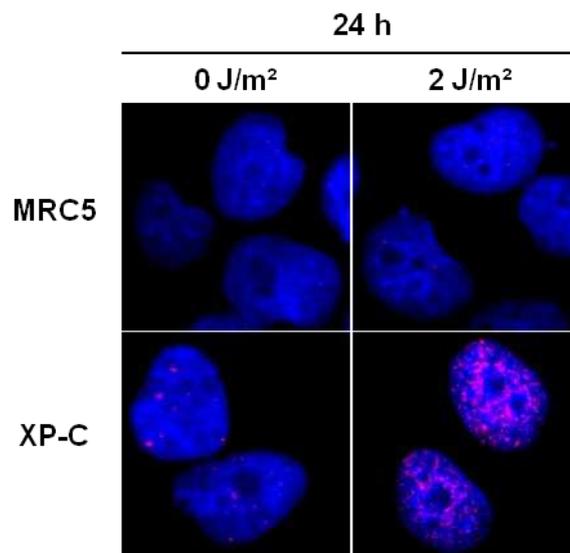


Figure 25. Immunofluorescence de γ H2AX dans les cellules MRC5 et XP-C 24 heures après 2 J/m^2 d'UVC. Des photos représentatives de trois expériences individuelles sont montrées.

A partir de l'observation microscopique des foyers γ H2AX des cellules MRC5 et XP-C, j'ai quantifié le pourcentage de cellules positives pour γ H2AX à différents temps après exposition aux UVC. La cinétique obtenue à 2 J/m^2 pour les deux lignées cellulaires est représentée dans la Figure 26.

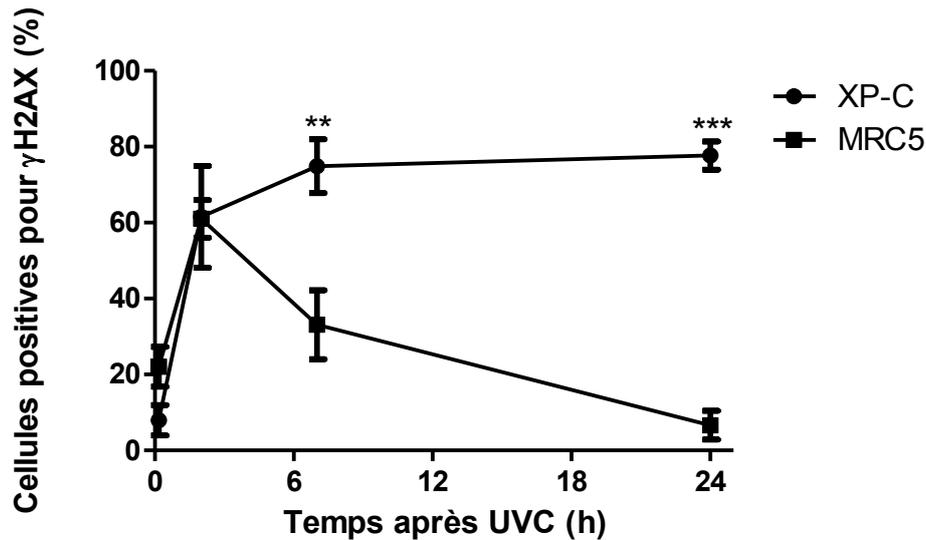


Figure 26. Quantification des cellules positives pour γ H2AX 10 minutes, 2, 7 et 24h après 2 J/m² d'UVC visualisées par immunofluorescence. Les cellules présentant plus de 15 foyers γ H2AX ont été considérées comme positives. Chaque point correspond à la moyenne d'au moins deux expériences indépendantes. Les erreurs standards sont représentées. La significativité des différences entre les cellules MRC5 et XP-C est indiquée (**P < 0,01; ***P < 0,001).

Dans les deux types cellulaires, il y a eu une augmentation de plus de 50% de cellules positives pour γ H2AX entre 10 minutes et 2 heures post UV. Cependant, la proportion de cellules XP-C positives pour γ H2AX a continué d'augmenter entre 2 heures et 24 heures suivant l'irradiation jusqu'à atteindre 78% de cellules positives pour γ H2AX, alors que le pourcentage de cellules MRC5 positives pour γ H2AX a diminué avec le temps et est revenu à sa valeur initiale à 24 heures post UV (Figure 26).

Par ailleurs, j'ai pu quantifier la formation de γ H2AX induite par les UV dans les cellules NER+ et XP-C grâce à la technique de cytométrie de flux (Figure 27). A partir du contrôle non irradié (0 J/m²), j'ai défini une fenêtre au-dessus de laquelle les cellules étaient considérées comme positives pour le marquage de γ H2AX. J'ai exclu les cellules en Sub-G1 (dans les fenêtres à gauche) et j'ai donc déterminé le pourcentage de cellules vivantes positives pour γ H2AX (dans la fenêtre en haut à droite) par rapport à la totalité de cellules vivantes (fenêtres à droite, en haut et en bas).

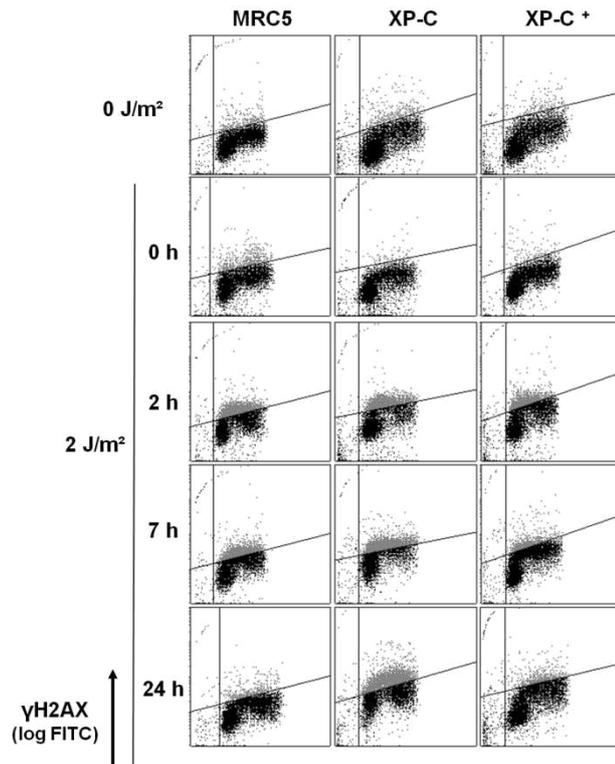


Figure 27. Formation de γ H2AX après irradiation aux UVC détectée par cytométrie de flux. Les cellules MRC5, XPC⁺ et XP-C ont été marquées pour γ H2AX à différents temps après exposition à 2 J/m² d’UVC ou en absence d’irradiation. Des fenêtres ont été définies pour chaque contrôle non irradié, à partir desquelles les pourcentages de cellules vivantes positives pour γ H2AX ont été déterminés. Des graphiques représentatifs d’au moins 2 expériences individuelles sont montrés.

La cinétique du pourcentage de cellules XP-C et XP-C⁺ positives pour γ H2AX obtenue à 2 J/m² est montrée dans la Figure 28.

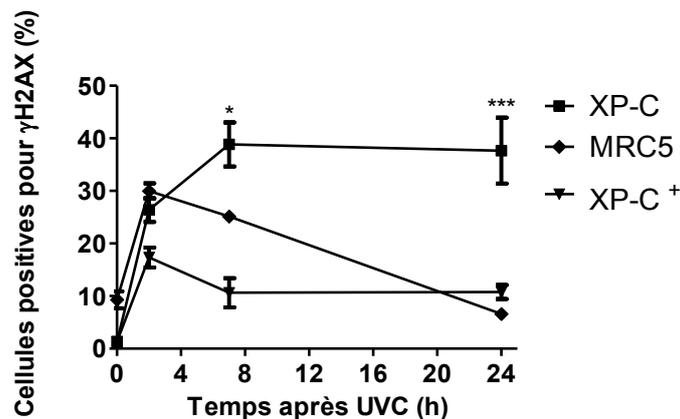


Figure 28. Quantification de la formation de γ H2AX dans les cellules XP-C et XP-C⁺ exposées à 2 J/m² au cours du temps par cytométrie de flux. Chaque point correspond à la moyenne (\pm s.e.m.) d’au moins deux expériences indépendantes. La significativité des différences entre les cellules XP-C⁺ et XP-C est indiquée (*P < 0,05; ***P < 0,001).

J'ai observé que, jusqu'à 2 heures après 2 J/m² d'UVC, le niveau de γ H2AX était augmenté dans toutes les lignées étudiées. Il a diminué dans les cellules NER+ jusqu'à atteindre son niveau basal 24 heures après UV mais il a continué d'augmenter dans les fibroblastes XP-C et a persisté jusqu'à au moins 24 heures après irradiation. Il est à noter que les pourcentages obtenus à 0 heure après exposition sont comparables à ceux en absence d'irradiation (voir Figure 27). En effet, j'ai déterminé des fenêtres qui n'annulaient pas totalement le pourcentage de cellules positives pour γ H2AX, afin de mimer la quantité basale de foyers γ H2AX dans les cellules non traitées observée en immunofluorescence. Ces résultats sont donc qualitativement identiques à ceux obtenus par quantification des foyers γ H2AX observés par immunofluorescence (Figure 25).

J'ai donc montré par deux techniques différentes, l'immunofluorescence et la cytométrie de flux, que l'irradiation aux UVC conduit à la formation de γ H2AX dans les lignées cellulaires NER+ et XP-C mais de façon plus importante au cours du temps dans ces dernières. Considérant que ces cellules ne sont pas capables d'éliminer les dommages provoqués par les UV, la phosphorylation de H2AX est donc liée à la présence des lésions provoquées par ce traitement.

1.2.3. Etude de la formation de γ H2AX en réponse aux rayons UVC en fonction du cycle cellulaire

Afin de mieux comprendre la formation de γ H2AX induite par une faible dose d'UVC dans les fibroblastes humains, nous avons déterminé ensuite dans quelles phases du cycle cellulaire l'exposition aux UV induit la phosphorylation de H2AX.

En co-marquant γ H2AX avec un anticorps anti- γ H2AX et le contenu en ADN par l'iodure de propidium (PI), j'ai pu déterminer la formation de γ H2AX en fonction du cycle cellulaire par cytométrie de flux (Figure 29). J'ai défini des fenêtres pour chaque phase du cycle cellulaire en fonction du contenu en ADN. Ceci m'a permis d'évaluer le marquage de γ H2AX séparément dans chacune des phases du cycle (Figure 30).

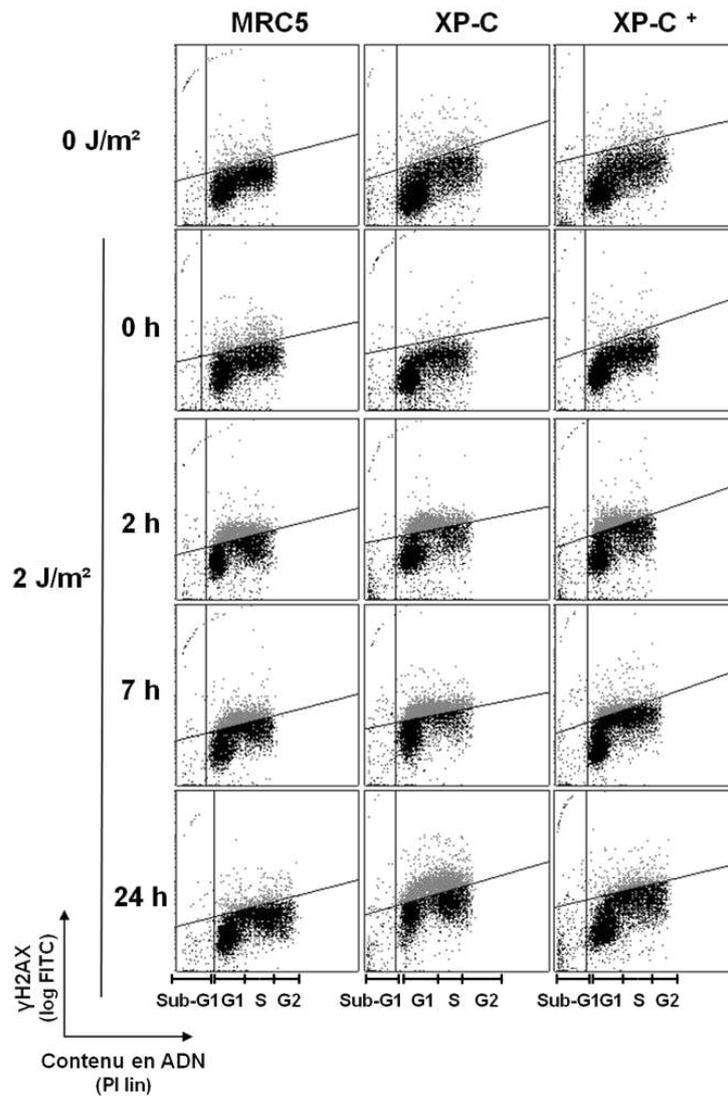


Figure 29. Formation de γ H2AX en fonction des phases du cycle cellulaire après irradiation aux UVC. Distribution des cellules MRC5, XPC⁺ et XP-C marquées pour γ H2AX dans les phases du cycle à différents temps après l'exposition à 2 J/m² d'UVC ou en absence d'irradiation. Des fenêtres ont été définies pour chaque contrôle non irradié, à partir desquelles les pourcentages de cellules positives pour γ H2AX ont été déterminés. Des graphiques représentatifs d'au moins 2 expériences individuelles sont montrés.

Afin de mieux évaluer la formation de γ H2AX, le marquage obtenu pour chaque phase du cycle en absence de traitement, considéré ainsi comme le niveau basal, est représenté en même temps que ceux obtenus après traitement. Ainsi un décalage vers la droite du pic de cellules marquées correspond à la formation de γ H2AX (Figure 30).

Dans les fibroblastes NER⁺, 2 heures après l'exposition à 2 J/m², le marquage de γ H2AX a augmenté dans les cellules en phases S et G2, et de façon plus importante en phase S, ainsi que dans une minorité de cellules en G1 (Figure 30). Une tendance similaire a été observée pour les cellules XP-C en phases S et G2, mais un signal plus

fort de γ H2AX a également été observé dans la totalité des cellules en phase G1, en particulier à des temps plus tardifs. En fait, 24 heures après l'irradiation aux UVC, les cellules XP-C ont présenté une augmentation significative du marquage de γ H2AX dans toutes les phases du cycle cellulaire, en opposition aux fibroblastes NER+. Le signal de γ H2AX dans les cellules XP-C a diminué 72 heures après l'exposition dans toutes les phases du cycle cellulaire, sans toutefois revenir au niveau de base (Figure 30). Ces résultats démontrent que la persistance de lésions induites par les UVC dans les cellules XP-C entraîne la phosphorylation de H2AX, qui ne se limite pas à une phase du cycle cellulaire spécifique.

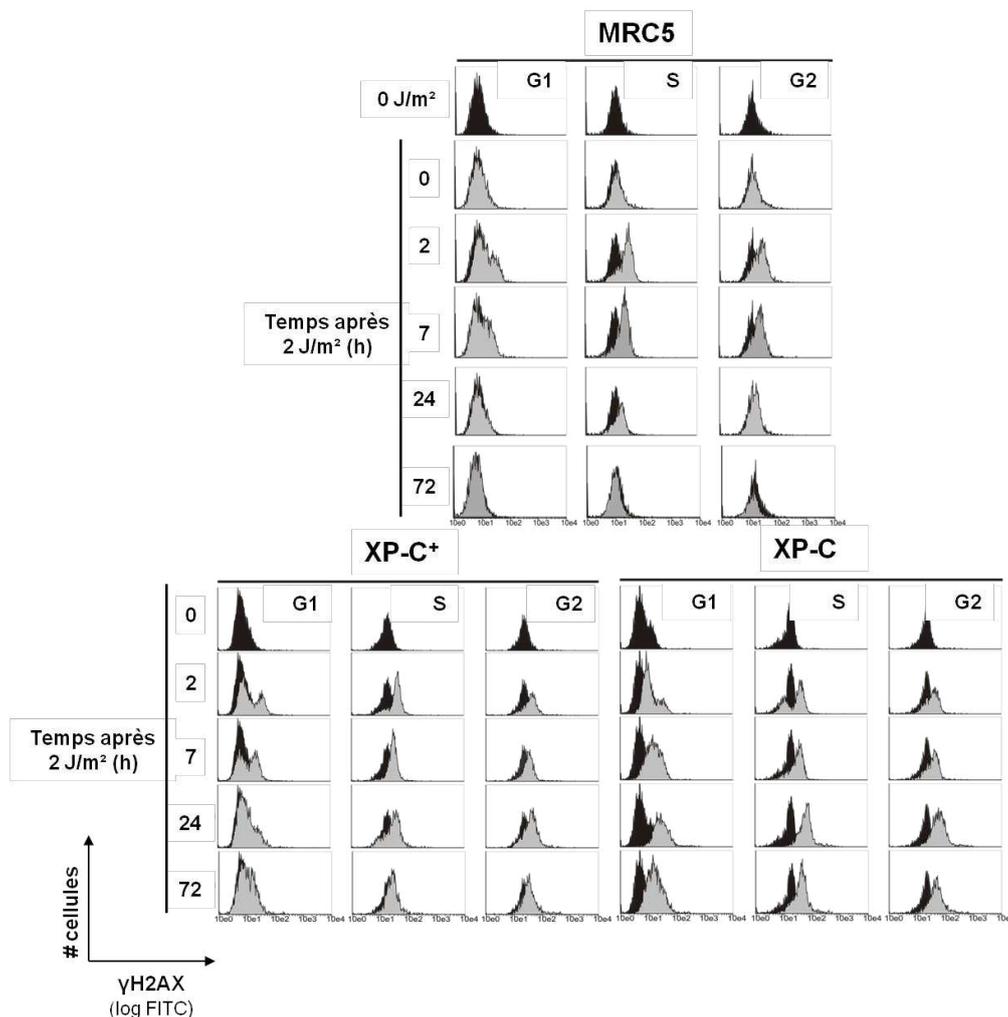


Figure 30. Distribution des cellules marquées pour γ H2AX dans les phases du cycle cellulaire à différents temps après irradiation aux UVC. Distribution des cellules MRC5, XPC⁺ et XP-C marquées pour γ H2AX dans chaque phase du cycle à différents temps après l'exposition à 2 J/m² d'UVC ou en absence d'irradiation. Les graphiques obtenus en absence d'irradiation pour les cellules MRC5 ou au moment de l'irradiation à 2 J/m² pour les cellules XP-C⁺ et XP-C sont montrés en noir et ceux obtenus 2, 7, 24 ou 72 heures après l'irradiation sont représentés en gris. Des graphiques représentatifs d'au moins 2 expériences individuelles sont montrés.

J'ai confirmé une partie de ces résultats par immunofluorescence en co-marquant le BrdU incorporé par les cellules en réplication et γ H2AX après une irradiation locale de 150 J/m² d'UVC. Le marquage de γ H2AX a été observé dans des noyaux positifs et négatifs pour le BrdU (résultat non montré). Par conséquent γ H2AX a été formé à la fois dans des cellules en réplication et dans des cellules en une autre phase du cycle cellulaire que celle de synthèse d'ADN.

En résumé, les rayons UVC induisent la formation de γ H2AX dans toutes les phases du cycle cellulaire dans les cellules déficientes en NER, et ce, de façon persistante au cours du temps jusqu'à au moins 24 heures après l'exposition. De plus, à ce temps, les cellules XP-C irradiées s'accumulent en phase G2 du cycle cellulaire, malgré une progression normale de la réplication.

2. Étude de lignées cellulaires déficientes en XPC et/ou en Pol η en réponse aux rayons UVC

Un des objectifs de notre travail portait sur l'étude de l'importance de l'ADN polymérase η (Pol η) dans la survie de cellules humaines déficientes en GGR exposées à une faible dose d'UVC. Afin de mieux répondre à cela, j'ai établi une lignée cellulaire stable déficiente à la fois en protéines XPC et Pol η . Et, j'ai évalué les réponses cellulaires et moléculaires de ces cellules ainsi que celles des lignées déficientes uniquement en XPC ou en Pol η à 2 J/m² d'UVC.

2.1 Etablissement de clones XP-C dont l'expression de l'ADN polymérase η est réduite par des vecteurs pEBV-shRNA

J'ai établi une lignée stable de fibroblastes humains déficients à la fois en XPC et Pol η . La stratégie a consisté à réprimer l'expression du gène POLH dans les cellules XP-C avec un siRNA (small interfering RNA) spécifique. Les siRNA sont des séquences d'ARN complémentaires à l'ARN messager (ARNm) codant la protéine d'intérêt et, leur hybridation conduit à leur dégradation grâce à un système endogène de régulation d'expression de gènes. Nous avons utilisé des vecteurs dérivés du virus d'Epstein-Barr (pEBV) portant un gène codant une séquence shRNA (short hairpin RNA) dont la prise en charge par la machinerie enzymatique cellulaire conduit à la formation d'une

séquence de siRNA. Ces vecteurs sont répliatifs et stables, ce qui nous a permis de réprimer de façon physiologique et stable dans le temps le gène cible. En effet, les vecteurs pEBV portent l'origine de répliation latente et une séquence codante la protéine EBNA-1 de l'EBV, ce qui maintient le plasmide sous forme épisomale i.e. non intégrée dans le génome. Par conséquent, il n'y a pas de risque d'intégration aléatoire dans une séquence d'un gène vital. De plus, la répliation de ce vecteur a lieu une fois par cycle cellulaire, garantissant un faible nombre de copies par cellule. Ceci représente un avantage dans la mesure où un nombre trop important de copies de plasmides par cellule peut saturer la machinerie d'ARN interférence et provoquer des effets secondaires indésirables comme la mort de la cellule (Biard et al. 2005; Biard 2007).

La transfection de cellules avec des vecteurs est faite via l'utilisation d'agents transfectants et elle est plus difficile lorsqu'il s'agit de cellules primaires. Même si celles-ci représentent un meilleur modèle cellulaire, nous avons effectué cette étape de l'étude à partir de cellules transformées qui sont plus facilement transfectables. D'où notre choix de travailler avec des cellules transformées dès la première partie du projet, pour pouvoir comparer directement les différentes lignées cellulaires simples-et double-déficientes.

Tout d'abord, j'ai transfecté les fibroblastes XP-C utilisés dans l'étude précédente avec deux vecteurs pEBV portant deux séquences différentes de shRNA dirigé contre l'ARNm codant la protéine Pol η . Le vecteur pEBV BD1045 porte un shRNA qui cible le cadre ouvert de lecture de l'ARNm de Pol η alors que le vecteur pEBV BD1047 cible la région non traduite en 3' de cet ARNm (Bétous et al. 2009; Rey et al. 2009). Les deux vecteurs contiennent en plus une cassette portant un gène dont l'expression confère une résistance à un antibiotique, l'hygromycine B. Les cellules effectivement transfectées par ces vecteurs ont été sélectionnées grâce à la mise en culture en présence de cet antibiotique. En parallèle, j'ai sélectionné les cellules XP-C et XP-C⁺ transfectées avec un vecteur pEBV portant un shRNA contrôle (shCTL).

Ensuite, j'ai validé la réduction du niveau d'expression de la protéine Pol η (Figure 31). J'ai vérifié que le vecteur portant le shCTL ne modifie pas l'expression de cette protéine par rapport aux cellules XP-C non transfectées. La sélection de cellules XP-C transfectées avec le vecteur pBD1045 m'a permis d'obtenir une population de cellules dont l'expression de Pol η a été significativement réduite par rapport aux cellules d'origine, comme le montre le western blot (Figure 31, gauche). Néanmoins, j'ai observé par immunofluorescence que cette population était hétérogène et que toutes

les cellules n'étaient pas « éteintes » pour l'expression de Pol η (Figure 31, droite). J'ai donc isolé des clones afin de pouvoir travailler avec un modèle homogène et choisir ceux dans lesquels le niveau d'extinction de Pol η était maximal.

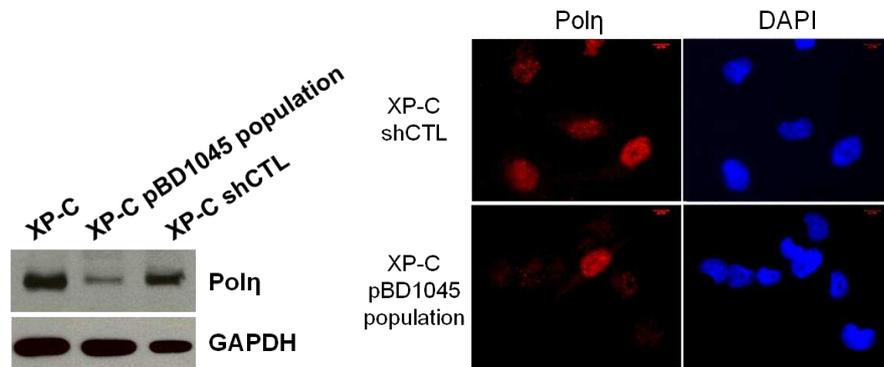


Figure 31. Validation de la réduction de l'expression de Pol η dans les cellules XP-C par western blot (gauche) et immunofluorescence (droite).

J'ai isolé des clones à partir des populations de cellules XP-C transfectées avec les vecteurs pBD1045 et pBD1047 et j'ai évalué leur niveau d'extinction de Pol η par western blot et immunofluorescence (Figure 32). D'après la Figure 32, nous pouvons observer que le niveau d'expression de Pol η était nettement réduit dans un des clones étudiés, le clone XP-C pBD1045 clone 1. Il a ainsi été choisi pour l'étude de la contribution de Pol η dans la survie des cellules XP-C et a été nommé XP-C/Pol η ^{KD}.

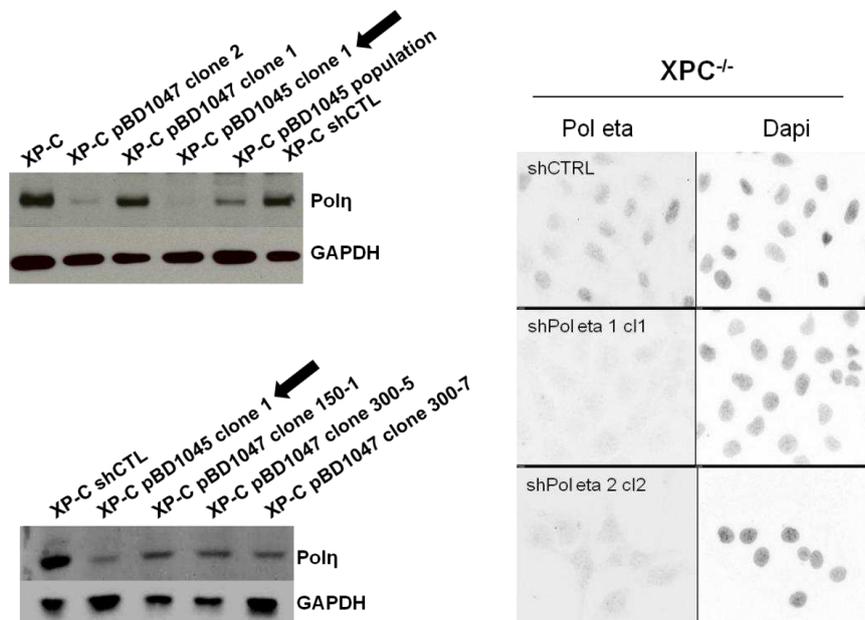


Figure 32. Détermination de l'efficacité de l'inactivation du gène POLH dans les différents clones isolés par western blot (gauche) et immunofluorescence (droite). Le clone pour lequel l'expression de Pol η a été la plus réduite est indiqué par les deux flèches.

En résumé, j'ai réussi à mettre au point un modèle clonal inédit de fibroblastes humains déficients à la fois en XPC et en Pol η . Ces cellules ont été cultivées pendant plus de 200 jours et l'efficacité de l'inactivation du gène POLH a été régulièrement vérifiée par western blot. Elles présentent un phénotype en culture tout à fait comparable à celui d'autres fibroblastes humains tels que les cellules parentales isogéniques XP-C. Malgré l'importance de ces protéines impliquées respectivement dans le syndrome du xeroderma pigmentosum de groupe C et V, les cellules déficientes à la fois en XPC et en Pol η sont donc viables en l'absence de dommages exogènes. Néanmoins, nous n'avons réussi à isoler qu'un seul clone satisfaisant, ce qui corrobore le rôle crucial de ces deux protéines dans des cellules humaines.

2.2 Étude des effets de l'irradiation à une faible dose d'UVC sur les cellules XP-C/Pol η ^{KD}

2.2.1 Les cellules humaines déficientes en XPC et Pol η présentent les deux phénotypes XP-C et XP-V et sont très sensibles à l'irradiation aux UVC

J'ai ensuite étudié les fibroblastes humains double-déficients XP-C/Pol η ^{KD} (Figure 33). Il est important de préciser que toutes les expériences avec ces cellules ont été faites en parallèle avec les cellules isogéniques XP-C et XP-C⁺ portant un shRNA contrôle (shCTL), même lorsque « shCTL » n'est pas précisé dans les figures.

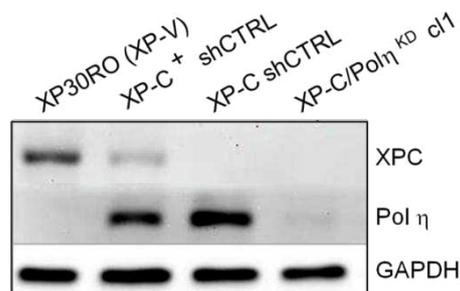


Figure 33. Les cellules XP-C/Pol η ^{KD} sont déficientes en XPC et en Pol η . L'expression endogène des protéines XPC et Pol η a été détectée par western blot dans les cellules XP-V, XP-C, XP-C⁺ et XP-C/Pol η ^{KD}

Tout d'abord, j'ai observé, pendant la culture, que le clone XP-C/Pol η ^{KD} avait une vitesse de prolifération plus lente que celle des cellules parentales XP-C. Afin de vérifier cela, la prolifération de ces cellules a été analysée en temps réel grâce à un

système qui permet de suivre l'impédance électrique à travers des microélectrodes intégrées en dessous de chaque puits (xCelligence system, Roche). À partir de l'impédance, l'index cellulaire est déterminé par un logiciel. Cette donnée correspond à l'espace du puits occupé par les cellules. L'index cellulaire est donc directement proportionnel au nombre de cellules dans un puits. J'ai ainsi évalué l'index cellulaire des cellules XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ et des cellules XP-C en absence de traitement toutes les heures environ, jusqu'à 96 heures (Figure 34). Et, j'ai ainsi confirmé que les XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ prolifèrent plus lentement que les cellules isogéniques XP-C. Ceci est en accord avec des résultats publiés précédemment avec des cellules U2OS (lignée de cellules humaines d'ostéosarcome) dont l'expression de $\text{Pol}\eta$ a été réduite par le même pEBV-shRNA (Rey et al. 2009).

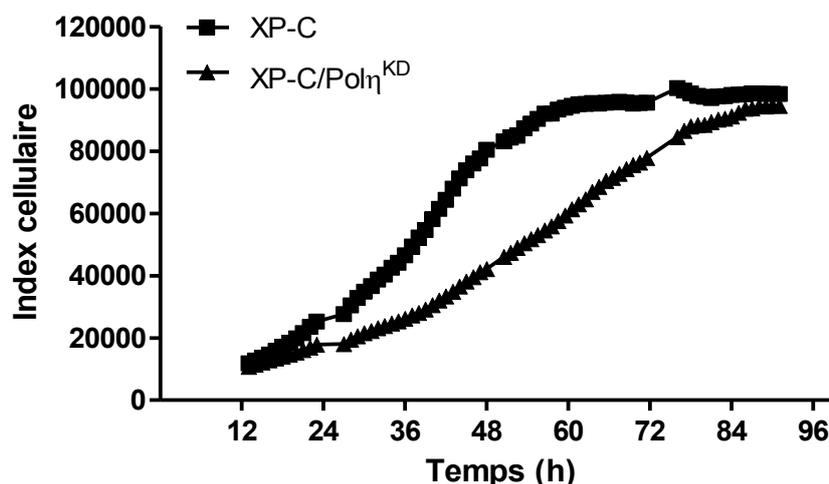


Figure 34. Prolifération des cellules XP-C et XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ en absence de traitement. L'index cellulaire de ces deux lignées cellulaires a été suivi en temps réel par xCelligence system.

Par ailleurs, la caractéristique du phénotype XP-V (déficience en $\text{Pol}\eta$ dans un fond NER+) est l'hypersensibilisation des cellules XP-V aux UV après addition de caféine (Lehmann et al. 1975; Cleaver 1989). Afin d'évaluer si le niveau d'expression de $\text{Pol}\eta$ était suffisamment faible, j'ai donc étudié la prolifération des cellules XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ exposées à différentes doses d'UVC en présence de 1 mM de caféine. Comme nous l'avons vu, les cellules XP-C sont très sensibles aux UVC et leur prolifération est fortement affectée déjà après exposition à 5 J/m² (Figure 19). Afin de pouvoir observer un éventuel effet de la caféine sur les cellules isogéniques XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$, j'ai décidé de

tester l'effet combiné des rayons UVC et de la caféine uniquement à des faibles doses d'UVC (1, 2 et 3 J/m²). Dans un premier temps, j'ai vérifié d'une part, que les conditions choisies permettaient d'observer la sensibilisation des cellules XP-V aux UVC par la caféine et d'autre part, que la prolifération des cellules XP-C⁺ n'était pas atteinte par ce double traitement (Figure 35). En effet, la prolifération des cellules XP-C⁺ irradiées n'a pas été affectée par la présence de caféine et est restée constante autour de 95% du contrôle non irradié quelque soit la dose d'UVC, en présence et en absence de caféine. Cependant, la prolifération des cellules XP-V a été réduite de presque moitié lorsque la caféine a été ajoutée aux cellules exposées à 1 J/m² (82% du contrôle non irradié en absence de caféine et 46% en présence de caféine). Suite à l'exposition à 2 J/m², cet effet a été encore plus prononcé avec 74% de cellules par rapport au contrôle en absence de caféine contre 19% du contrôle en présence de caféine. Donc, les cellules naturellement déficientes en Polη ont été fortement sensibilisées par la présence de caféine dès l'exposition à 1 J/m².

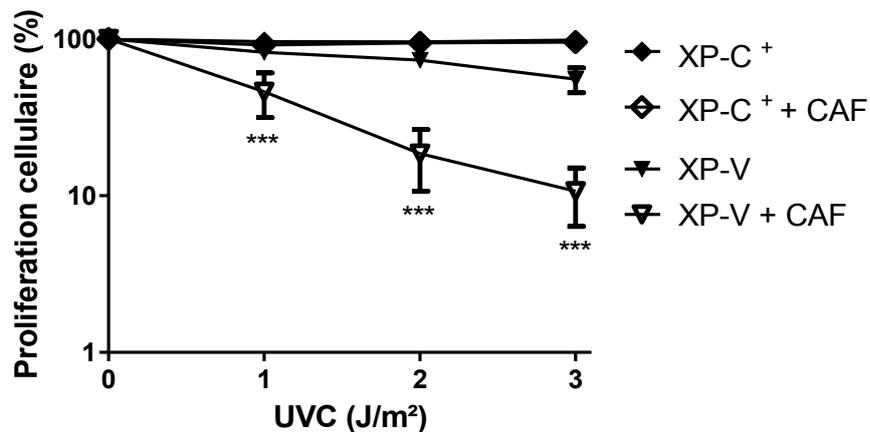


Figure 35. Prolifération cellulaire 72 heures après différentes doses d'UVC en présence ou en absence de 1 mM de caféine (CAF). La prolifération des cellules XP-C⁺ et XP-V a été évaluée par le test XTT et est représentée en pourcentage par rapport au contrôle non irradié correspondant. Chaque point représente la moyenne (\pm s.e.m.) de 3 expériences indépendantes. La significativité des différences entre l'irradiation aux UVC en présence et en absence de caféine dans les cellules XP-V est indiquée (***) P < 0,001).

D'après la Figure 36, la présence de la caféine a également diminué la prolifération des cellules XP-C/Polη^{KD} dès la dose de 1 J/m² par rapport à celle des cellules exposées uniquement aux UVC. En effet, les cellules XP-C/Polη^{KD} ont présenté une prolifération

à 75% du contrôle non irradié en réponse uniquement à l'exposition à 1 J/m² contre 25% en présence en plus de caféine. L'effet de la caféine sur ces cellules double-déficientes a été encore plus prononcé après 2 J/m² où la caféine a provoqué une réduction de 90% dans la prolifération cellulaire par rapport à celle en absence de caféine. Par contre, la prolifération des cellules XP-C n'a pas été affectée par la présence de caféine après 1 J/m² (94% et 86% du contrôle respectivement en absence et présence de caféine après 1 J/m²). Néanmoins, à partir de 2 J/m², la prolifération de ces cellules a été modifiée par ce double traitement. À cette dose, la prolifération des cellules XP-C a été réduite de 50% lorsque la caféine a été ajoutée au milieu de culture (Figure 36). Ces résultats montrent que le niveau d'expression de Polη dans les cellules XP-C/Polη^{KD} est suffisamment faible pour que la caféine aggrave leur sensibilité aux UV, comme elle le fait pour les cellules XP-V. Par conséquent, ces résultats confirment fonctionnellement l'extinction de Polη dans les fibroblastes humains XP-C.

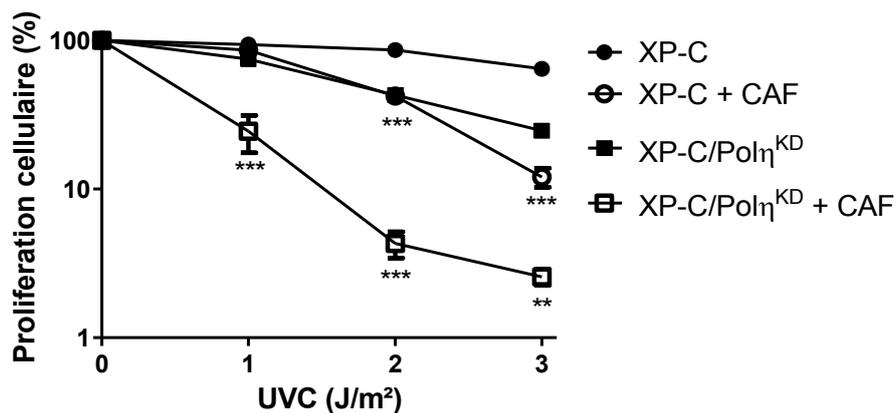


Figure 36. Prolifération cellulaire 72 heures après différentes doses d'UVC en présence ou en absence de 1 mM de caféine (CAF). La prolifération des cellules XP-C et XP-C/Polη^{KD} a été évaluée par test XTT et est représentée en pourcentage par rapport au contrôle non irradié correspondant. Chaque point représente la moyenne (\pm s.e.m.) de 3 expériences indépendantes. La significativité des différences entre l'irradiation aux UVC en présence et en absence de caféine dans les cellules XP-C et XP-C/Polη^{KD} est indiquée (**P < 0,01; ***P < 0,001).

Ensuite, j'ai caractérisé les conséquences de l'extinction de Polη dans les réponses cellulaires et moléculaires des cellules XP-C. Tout d'abord, j'ai pu constater lors de l'étude de prolifération des cellules irradiées en présence et en absence de caféine (Figure 36), que les cellules XP-C/Polη^{KD} présentaient une prolifération diminuée par rapport à celle des cellules XP-C en réponse uniquement aux UV. Afin de confirmer cette observation, les fibroblastes isogéniques XP-C et XP-C/Polη^{KD} ont été

irradiés à 2, 5 et 10 J/m² d'UVC et comptés 72 heures plus tard (Figure 37). Les résultats montrent clairement que la prolifération des cellules XP-C/Polη^{KD} a été beaucoup plus perturbée par l'irradiation aux UVC que celle des cellules XP-C. En effet, 72 heures après 2 et 5 J/m² les cellules XP-C étaient respectivement à 69% et à 48% de leur contrôle non irradié alors que les cellules XP-C/Polη^{KD} étaient respectivement à 45% et à 18% de leur contrôle non irradié. Après 10 J/m², les cellules XP-C étaient à près de 20% de leur contrôle alors que la quasi-totalité des cellules XP-C/Polη^{KD} étaient mortes (Figure 37).

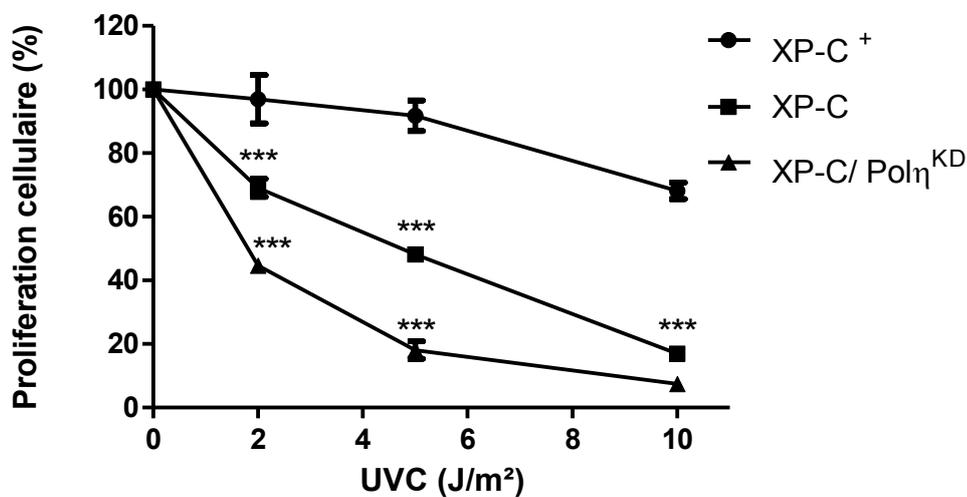


Figure 37. Prolifération des fibroblastes XP-C⁺, XP-C et XP-C/Polη^{KD} 72 heures après 2, 5 et 10 J/m² d'UVC. Chaque point représente la moyenne et les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard d'au moins trois expériences réalisées de façon indépendante. La significativité des différences entre les cellules XP-C et XP-C⁺ ainsi que celle entre les cellules XP-C et XP-C/Polη^{KD} sont indiquées (***) ($P < 0,001$).

A partir de ce résultat obtenu pour le clone dont l'extinction de Polη était maximale par rapport aux autres clones isolés, je me suis demandée si l'inactivation du gène POLH obtenue dans ces autres clones (Figure 32) ne serait tout de même pas suffisante pour avoir un effet sur la diminution de l'expression de Polη. Et, d'après la Figure 38, le clone choisi (XP-C pBD1045 clone 1, XP-C/Polη^{KD}) a effectivement été le seul à présenter une diminution de la prolifération après exposition aux UVC par rapport aux cellules isogéniques XP-C. Ce résultat confirme que l'extinction de Polη doit être maximale pour que la cellule présente un phénotype associé.

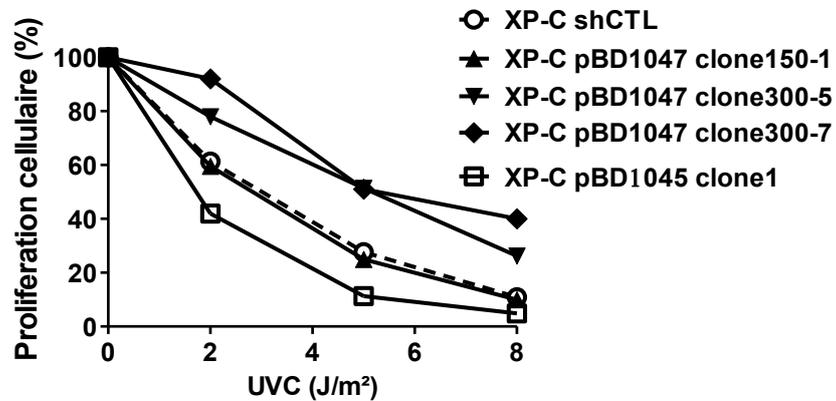


Figure 38. Prolifération des différents clones isolés 72 heures après 2, 5 et 8 J/m² d'UVC. Chaque point représente le pourcentage de prolifération des cellules irradiées par rapport à celle du contrôle non irradié.

La prolifération des cellules XP-C/Pol η ^{KD} était donc plus fortement altérée 72 heures après exposition aux UVC que celle des fibroblastes XP-C. Néanmoins, ces cellules semblaient survivre aux plus faibles doses d'UVC testées, 2 et 5 J/m². Je me suis demandée quel serait l'effet de ces doses sur une période post UVC plus longue. J'ai donc étudié la prolifération cellulaire six jours après l'irradiation à ces 2 doses d'UV (Figure 39). Et, j'ai pu constater que les cellules XP-C/Pol η ^{KD} n'ont survécu qu'à 2 J/m².

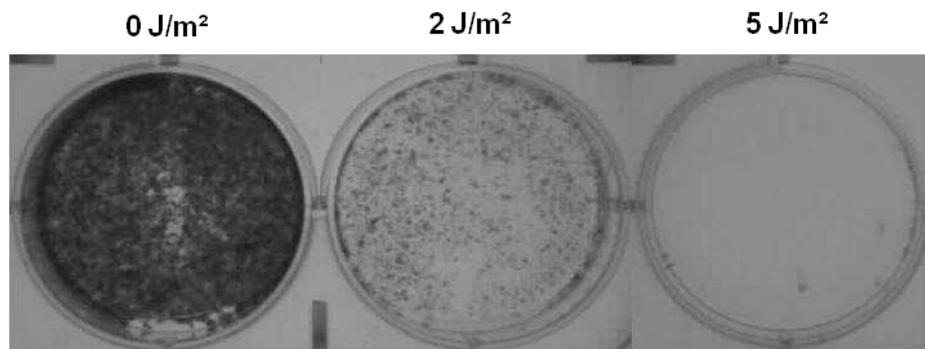


Figure 39. Prolifération des cellules XP-C/Pol η ^{KD} 6 jours après 2 et 5 J/m². Les cellules XP-C/Pol η ^{KD} ont été fixées et colorées au crystal violet 6 jours après l'exposition aux UVC.

J'ai quantifié la prolifération des fibroblastes XP-C⁺, XP-V (déficients en Polη), XP-C et XP-C/Polη^{KD} 6 jours après l'exposition à 2 J/m² (Figure 40). Comme attendu, un défaut en Polη sur un fond NER+ (cellules XP-V) sensibilise les cellules aux UVC (60% du contrôle non irradié) mais pas autant que les cellules XP-C déficientes en GGR (22% du contrôle). De plus, j'ai observé de nouveau que l'extinction de Polη dans les cellules XP-C a conduit à une sensibilité très importante de ces cellules même à une faible dose d'UVC avec une prolifération à 6% du contrôle non irradié (Figure 40). Par conséquent, la sensibilisation des cellules XP-C par l'extinction de Polη observée à 3 jours après exposition à 2J/m² (prolifération des cellules XP-C/Polη^{KD} à 65% de celle des fibroblastes XP-C) a été encore plus prononcée 6 jours après (prolifération des cellules XP-C/Polη^{KD} était à 27% de celle des fibroblastes XP-C).

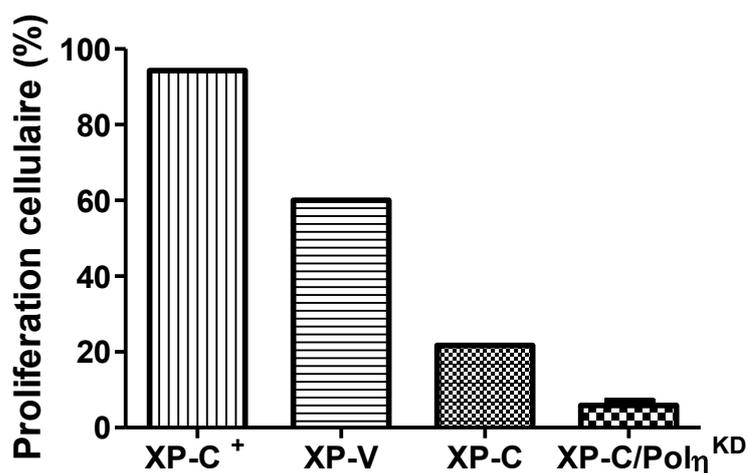


Figure 40. Prolifération des fibroblastes XP-C⁺, XP-V, XP-C et XP-C/Polη^{KD} 6 jours après l'exposition à 2 J/m² d'UVC. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle non irradié.

Afin de mieux comprendre les effets de l'exposition aux UVC sur la prolifération des cellules XP-C/Polη^{KD}, j'ai analysé le cycle cellulaire et l'induction de la fragmentation de l'ADN de ces cellules irradiées avec 2 J/m² par cytométrie de flux.

Tout d'abord, j'ai observé qu'en absence de traitement, les cellules XP-C/Polη^{KD} présentaient un cycle cellulaire comparable à celui des cellules isogéniques XP-C, malgré un taux de prolifération réduit (Figures 41-43 et 21). Jusqu'à 7 heures après 2 J/m², les fibroblastes XP-V et XP-C/Polη^{KD} avaient une distribution dans les phases du cycle cellulaire (Figures 41 et 43) comparable à celle observée pour les cellules NER+ et XP-C (Figures 21 et 22).

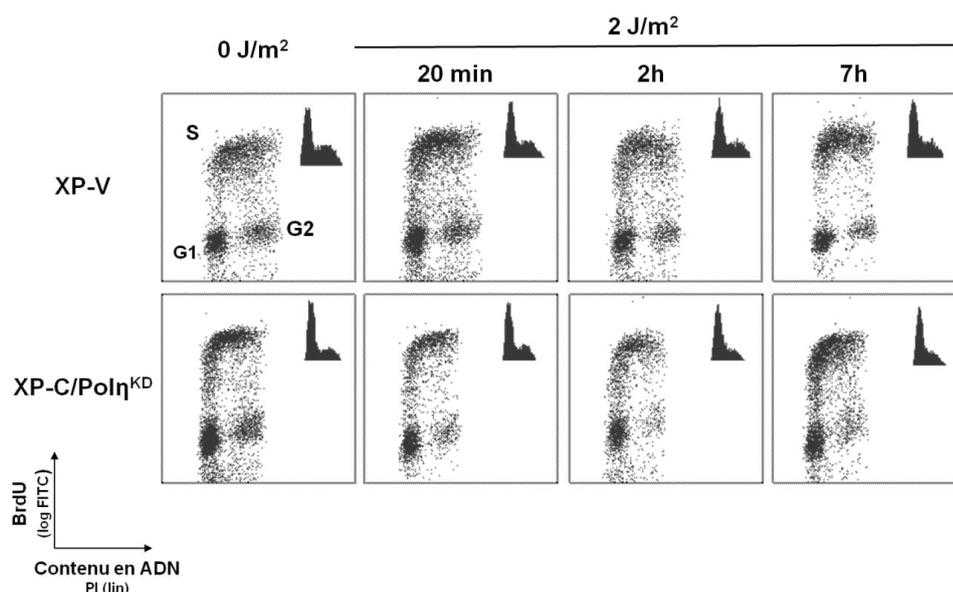


Figure 41. Cycles cellulaires des fibroblastes XP-V et XP-C/Pol η^{KD} aux temps courts après l'exposition à 2 J/m 2 . Les graphiques représentent l'incorporation de BrdU en fonction du contenu en ADN. Les trois phases du cycle sont indiquées dans le premier graphique en haut à gauche. Cette expérience a été faite 2 fois individuellement et des graphiques représentatifs sont montrés. En haut à droite de chaque graphique, la distribution correspondante des cellules dans les phases du cycle observée uniquement par le marquage du contenu en ADN par PI est indiquée.

Néanmoins, 24 heures après 2 J/m 2 , les fibroblastes XP-V se sont accumulés en phase S avec 11% de cellules en répllication en plus qu'en absence de traitement (66% versus 55%) (Figures 42 et 43). En outre, 72 heures après l'exposition aux UVC, les cellules XP-V ont présenté une légère accumulation de cellules en phase G2 (21% de cellules en G2 après irradiation versus 17% de cellules non traitées). De façon comparable, 24 heures après irradiation, les fibroblastes XP-C/Pol η^{KD} se sont accumulés en phase S (58% de cellules en répllication après UVC et 45% en absence de traitement). Cependant, ces cellules se sont également accumulées en phase G2, comme les cellules isogéniques XP-C (Figure 22, 42 et 43). A 72 heures post UVC, les fibroblastes XP-C/Pol η^{KD} étaient toujours arrêtés en phase G2 (24% et 36% de cellules en G2, respectivement 24 et 72 heures après UVC, par rapport à 14% sans aucun traitement). De plus, l'incorporation du BrdU était totalement hétérogène, ce qui indique que la répllication de l'ADN était complètement perturbée 72 heures après 2 J/m 2 (Figure 42). Enfin, 24 heures après une dose plus élevée d'UVC (5 J/m 2), les cellules XP-V se sont clairement accumulées en début de phase S, tandis que les cellules XP-C/Pol η^{KD} ont présenté une accumulation accrue de cellules à la fois en phases S et G2 conjointement à une diminution drastique de l'incorporation de BrdU (Figure 42).

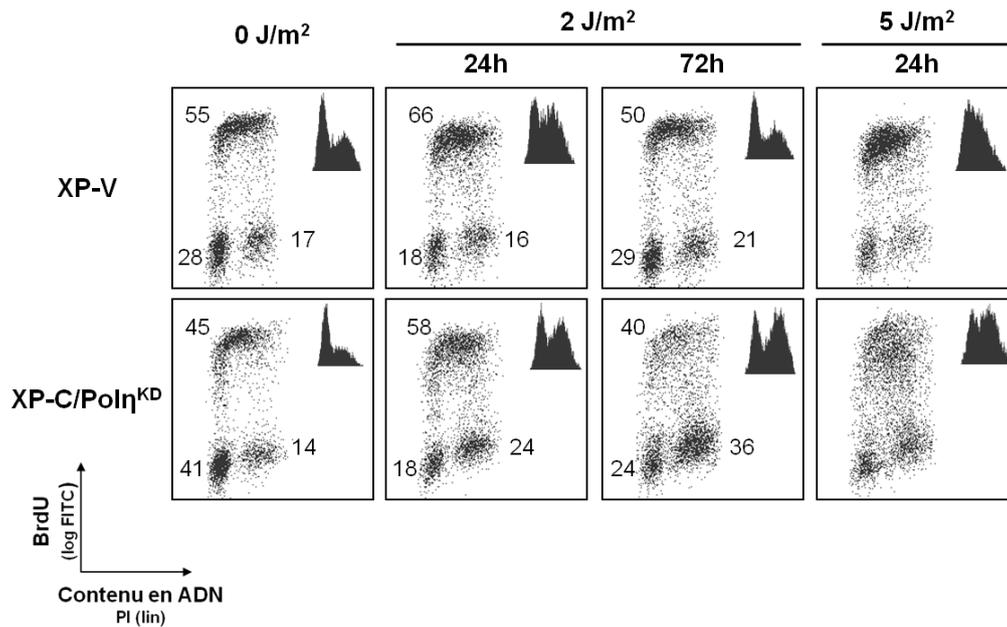


Figure 42. Cycles cellulaires des fibroblastes XP-V et XP-C/Pol η^{KD} aux temps longs après l'exposition à 2 J/m². Cette expérience a été faite 3 fois individuellement et des graphiques représentatifs sont montrés. En haut à droite de chaque graphique, la distribution correspondante des cellules dans les phases du cycle observée uniquement par le marquage du contenu en ADN par PI est indiquée.

En outre, 22% de cellules XP-C/Pol η^{KD} ont été retrouvées en Sub-G1 72 heures après 2 J/m², alors qu'aucune fragmentation significative de l'ADN n'a été détectée dans les cellules XP-V irradiés (Figure 43).

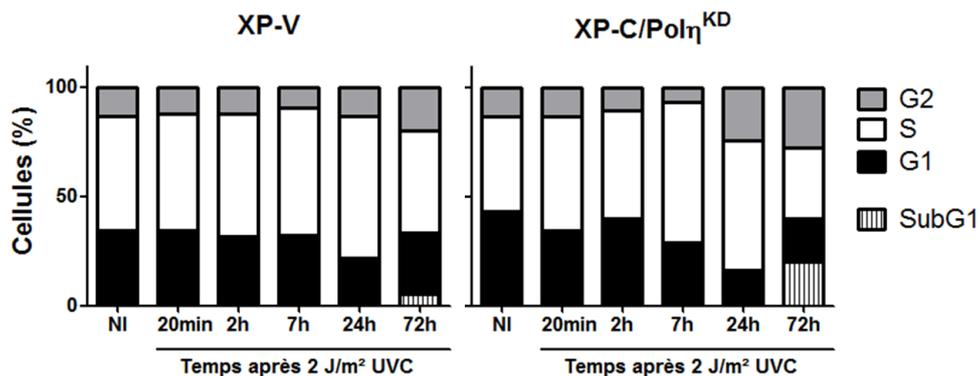


Figure 43. Distribution dans les phases du cycle cellulaire des cellules XP-V et XP-C/Pol η^{KD} à différents temps après 2 J/m². Les histogrammes représentent la moyenne des pourcentages de cellules dans chaque phase du cycle obtenus à partir du co-marquage de BrdU et du contenu en ADN réalisé au moins 2 fois de façon indépendante. Le contrôle non irradié (NI) correspondant au temps 24 heures est indiqué. La fraction de cellules en Sub-G1 est indiquée 72 heures après 2 J/m².

En résumé, j'ai réussi à valider l'extinction de Pol η dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD} d'un point de vue fonctionnel. En effet, j'ai montré que l'extinction de Pol η a provoqué, d'une part, une diminution de la prolifération des cellules XP-C en absence de traitement, et d'autre part, une sensibilisation de ces cellules à une exposition aux UVC par la caféine, caractéristique des cellules XP-V. Ensuite j'ai étudié les réponses aux dommages provoqués par les UVC de ces cellules déficientes en NER et en Pol η . Tout d'abord, j'ai observé que la prolifération de ces cellules a été plus affectée par des faibles doses d'UVC que celle des cellules isogéniques XP-C. Par ailleurs, 24 heures après irradiation, les cellules XP-C/Pol η ^{KD} se sont accumulées à la fois en phases S et G2 de leur cycle cellulaire, montrant ainsi qu'elles ont à la fois le phénotype d'une cellule XP-V et d'une cellule XP-C. Par contre, à la différence des lignées déficientes en NER ou en Pol η , 72 heures après UV, leur cycle cellulaire était complètement altéré. En effet, la progression des fourches de répllication était perturbée d'une part, et d'autre part l'arrêt en G2 était encore plus prononcé qu'à 24 heures après l'irradiation. Enfin, à ce temps, l'exposition à 2 J/m² n'a induit une fraction significative de cellules en Sub-G1 que dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD}.

2.2.2 L'exposition à une faible dose d'UVC induit des niveaux élevés de γ H2AX dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD}

J'ai ensuite étudié le niveau de phosphorylation de H2AX dans les cellules humaines déficientes à la fois en XPC et en Pol η . La quantification du marquage de γ H2AX au cours du temps après 2 J/m² par cytométrie de flux a montré que le nombre de cellules XP-C et XP-V positives pour γ H2AX étaient similaires aux différents temps étudiés (Figure 44). A 24 heures post UVC, respectivement 38% et 31% des cellules XP-C et XP-V étaient positives pour ce marquage alors que pratiquement deux fois plus de cellules XP-C/Pol η ^{KD} (60%) étaient positives pour γ H2AX.

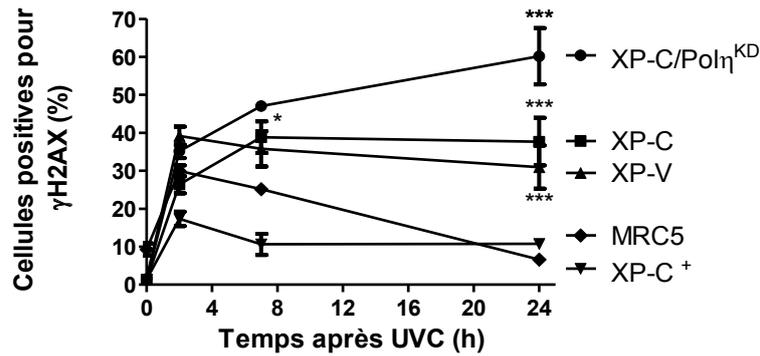


Figure 44. Quantification de la formation de γ H2AX dans les cellules NER+, XP-C, XP-V et XP-C/Pol η ^{KD} exposées à 2 J/m² au cours du temps par cytométrie de flux. Chaque point correspond à la moyenne (\pm s.e.m.) d'au moins deux expériences indépendantes. Les significativités des différences entre les cellules XP-C et XP-V par rapport aux cellules MRC5 ainsi que celle entre les cellules XP-C/Pol η ^{KD} et les cellules XP-C et XP-V sont indiquées (*P < 0,05; ***P < 0,001).

Le double marquage de γ H2AX et du contenu en ADN m'a permis d'évaluer la formation de γ H2AX en fonction des phases du cycle cellulaire (Figure 45). A partir du contenu en ADN, j'ai défini chaque phase du cycle. J'ai pu ainsi analyser la formation de γ H2AX dans chacune des phases du cycle cellulaire (Figure 46).

Dans les fibroblastes XP-V, le marquage de γ H2AX a augmenté jusqu'à 24 heures après UVC dans les cellules en phase G2, dans une minorité de cellules en phase G1 et, de façon plus importante, dans les cellules en phase S (Figure 46). Ce marquage était presque indétectable 72 heures plus tard. Comme pour les cellules XP-C, les fibroblastes XP-C/Pol η ^{KD} ont présenté une augmentation du signal γ H2AX dans toutes les phases du cycle cellulaire en réponse à 2 J/m² d'UVC (Figure 46).

Toutefois, j'ai mis en évidence une population de cellules XP-C/Pol η ^{KD} présentant un marquage plus intense de γ H2AX, qui se distingue clairement du reste des cellules marquées (Figure 46). Ce signal important de γ H2AX a été décrit précédemment par Cleaver et coll., en tant que niveaux élevés de γ H2AX (en anglais, high levels of γ H2AX) (de Feraudy et al. 2010; Cleaver 2011). Cette population a été détectée à plus de 10e2 en log FITC (« hauts niveaux de γ H2AX », Figure 46) et je l'ai observée, pour la première fois, dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD} en phases S et G2 du cycle cellulaire 24 heures après 2 J/m² (Figures 45 et 46). A 72 heures après l'exposition, des cellules XP-C/Pol η ^{KD} présentant des niveaux élevés de γ H2AX ont été retrouvées dans toutes les phases du cycle (Figure 46).

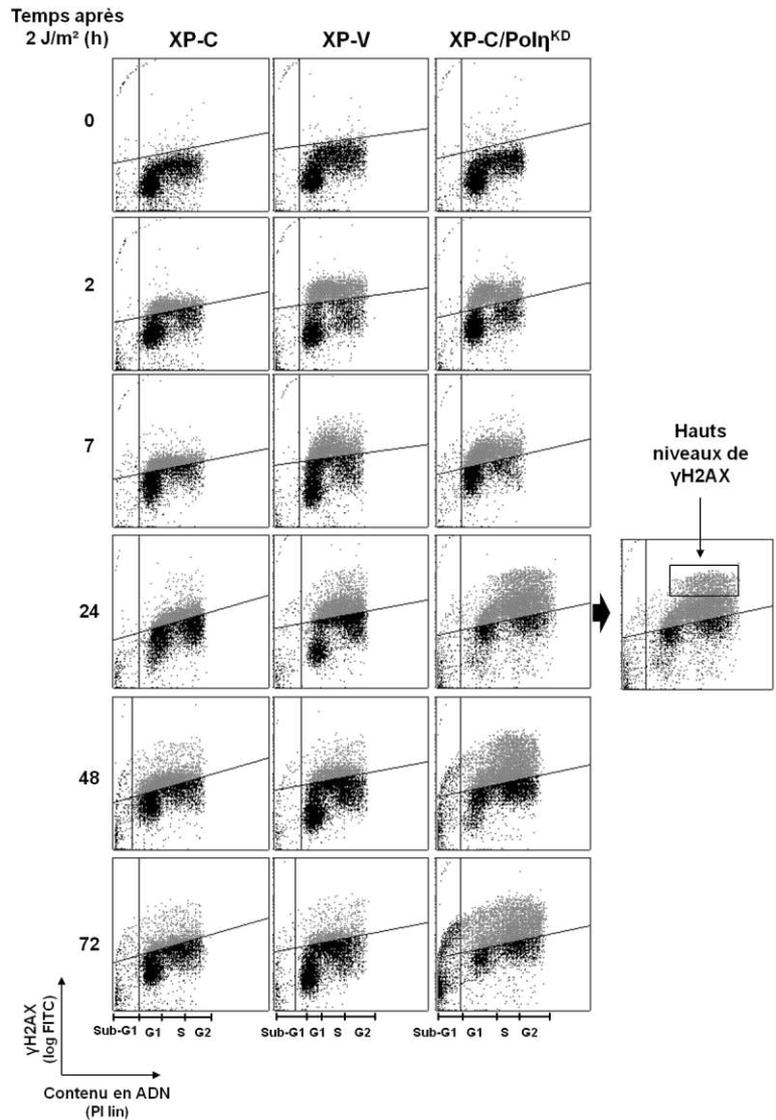


Figure 45. Formation de γ H2AX en fonction des phases du cycle cellulaire après irradiation aux UVC. Distribution des cellules XP-C, XP-V et XP-C/Pol η ^{KD} marquées pour γ H2AX dans les phases du cycle à différents temps après l'exposition à 2J/m² d'UVC ou en absence d'irradiation. Des graphiques représentatifs d'au moins 2 expériences individuelles sont montrés. Le rectangle indique les cellules XP-C/Pol η ^{KD} présentant des niveaux élevés de γ H2AX (« hauts niveaux de γ H2AX »).

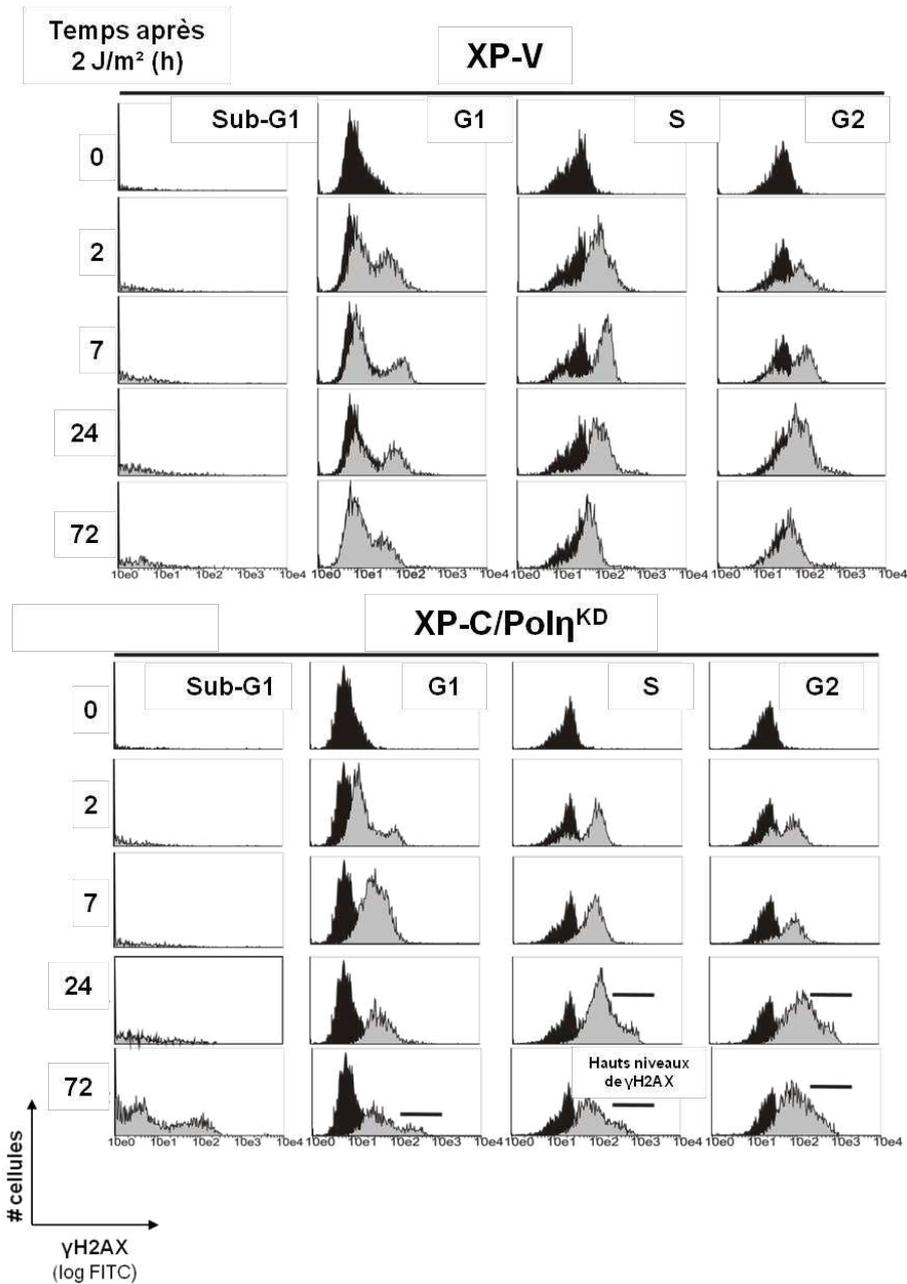


Figure 46. Distribution des cellules marquées pour γ H2AX dans les phases du cycle cellulaire, différents temps après irradiation aux UVC. Les graphiques obtenus au moment de l'irradiation à 2 J/m^2 sont montrés en noir et ceux obtenus 2, 7, 24 ou 72 heures après l'irradiation sont représentés en gris. Des graphiques représentatifs d'au moins 2 expériences individuelles sont montrés. Les barres horizontales en gras indiquent les niveaux élevés de γ H2AX (« hauts niveaux de γ H2AX »).

En résumé, une exposition à 2 J/m^2 d'UVC a conduit à la formation de γ H2AX dans toutes les phases du cycle cellulaire des cellules XP-C/Polη^{KD} 24 heures après traitement. Néanmoins, j'ai détecté des cellules XP-C/Polη^{KD} présentant des niveaux élevés de γ H2AX uniquement dans les phases S et G2.

2.2.3 L'exposition à une faible dose d'UVC induit des cassures simples- et double-brins de l'ADN dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD}

Afin de mieux comprendre la pertinence du marquage de γ H2AX en termes de cassures de l'ADN, j'ai évalué la formation de cassures simples- (CSB) et doubles-brins (CDB) de l'ADN, grâce au test des comètes en conditions alcalines (dénaturantes pour l'ADN). Tout d'abord, j'ai voulu vérifier que, dans nos conditions expérimentales, l'exposition à 2 J/m² d'UVC ne provoquait pas directement de cassures de l'ADN (Figure 47). J'ai ainsi réalisé le test des comètes immédiatement après l'irradiation des cellules XP-C⁺, XP-V, XP-C et XP-C/Pol η ^{KD}. Les résultats sont exprimés en moyenne des moments de la queue de la comète, le moment de la queue étant le produit de la longueur de la queue de la comète par la fraction d'ADN présent dans la queue de la comète par rapport à l'ADN total. Par conséquent, le moment de la queue est directement proportionnel à la quantité de cassures de l'ADN. D'après la figure 47, il n'y a pas eu de différence entre les moments de la queue obtenus sans irradiation et après 2 J/m² pour aucune lignée cellulaire testée. Donc, comme attendu, les rayons UVC ne cassent pas directement l'ADN.

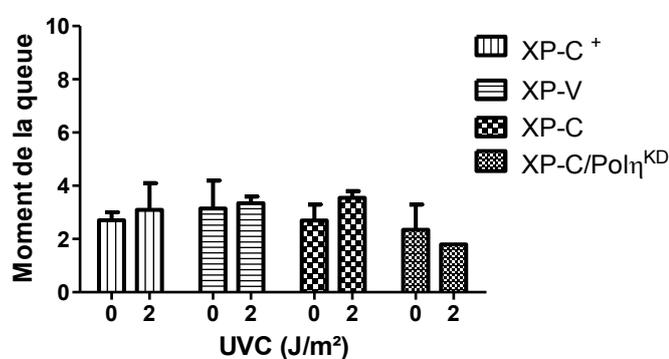


Figure 47. Détection de cassures de l'ADN immédiatement après exposition aux UVC par le test des comètes en conditions alcalines. Les histogrammes représentent la moyenne (\pm s.e.m) des moments de la queue obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes.

Ensuite, j'ai évalué si une exposition aux UVC pourrait conduire à la formation de cassures de l'ADN. Et, ce test a été effectué dans les conditions pour lesquelles le marquage de γ H2AX a été maximum pour les trois lignées cellulaires déficientes, c'est-à-dire, 24 heures après une exposition à 2 J/m² d'UVC (Figure 48 et 49).

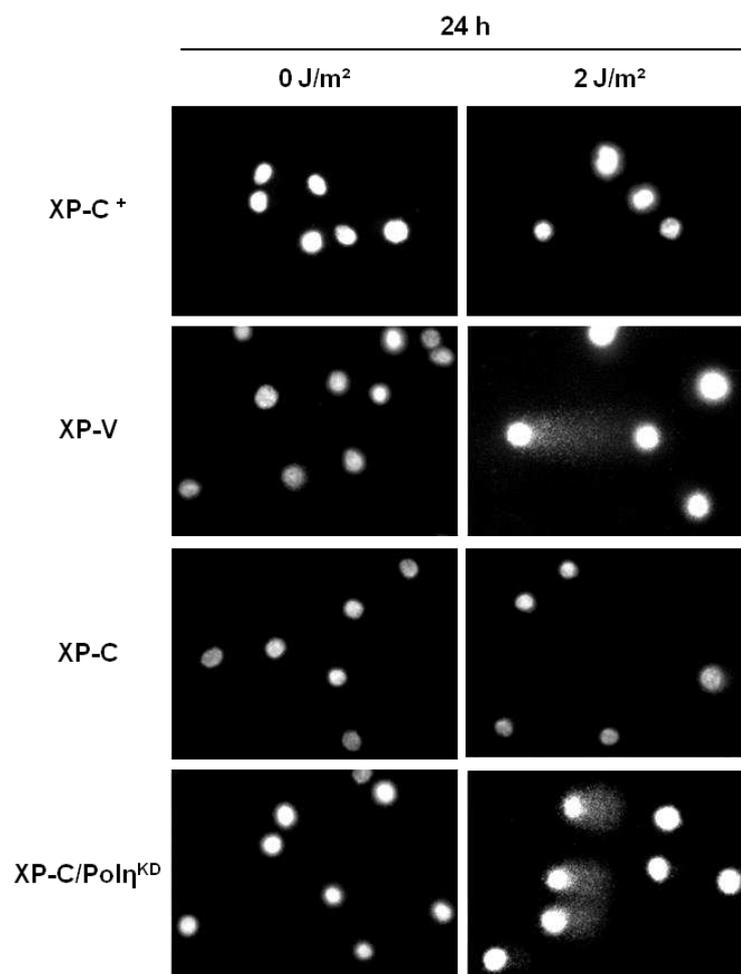


Figure 48. Visualisation des comètes en conditions alcalines 24 heures après exposition à 2 J/m² d'UVC. Toutes les quantifications des tests des comètes ont été effectuées à partir d'images comme celles montrées ici.

En accord avec les données obtenues pour la formation de γ H2AX, je n'ai pas détecté de cassures dans les cellules XP-C⁺. Par contre, dans les cellules XP-V et XP-C/Polη^{KD}, l'induction de cassures due à l'exposition à 2 J/m² a été significative par rapport au contrôle non irradié (Figure 49). Cette induction a été plus importante dans les cellules XP-C/Polη^{KD}, le moment de la queue étant de 7,6 pour ces cellules et de 3 pour les cellules XP-V (Figure 49). Cependant, de façon surprenante, je n'ai pas détecté de cassures de l'ADN dans les cellules XP-C (Figures 48 et 49), malgré le fort marquage de γ H2AX observé 24 heures après irradiation à 2 J/m² d'UVC.

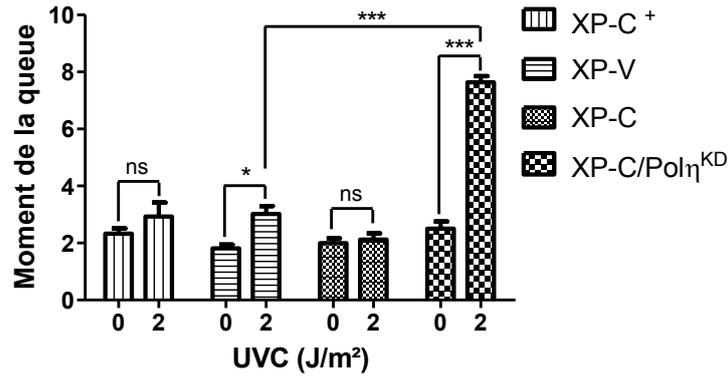


Figure 49. Détection de cassures de l'ADN 24 heures après exposition à 2 J/m² d'UVC par le test des comètes en conditions alcalines. Les histogrammes représentent la moyenne (\pm s.e.m) des moments de la queue obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata. Les significativités des différences entre 0 et 2 J/m² pour les cellules XP-V et XP-C/Polη^{KD} ainsi que celles entre ces deux cellules irradiées (*P < 0,05; ***P < 0,001).

En considérant que le test des comètes en conditions alcalines permet de détecter à la fois des cassures simples- et doubles-brins de l'ADN, j'ai réalisé le test des comètes en conditions neutres (non dénaturantes) afin d'évaluer uniquement la formation de CDB de l'ADN (Figure 50). Ce test a été effectué deux fois indépendamment en triplicata et, malgré les importantes barres d'erreur, j'ai observé à chaque fois une tendance à la formation de CDB dans les XP-C/Polη^{KD} irradiées, mais pas dans les fibroblastes XP-C et XP-V (Figure 50).

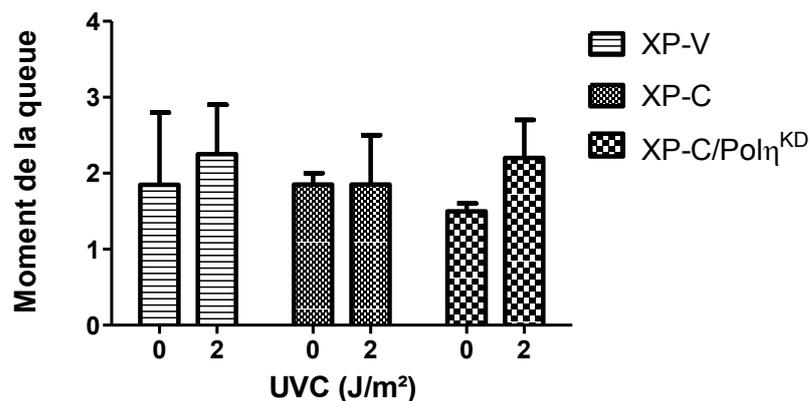


Figure 50. Détection de cassures double-brin de l'ADN 24 heures après exposition à 2 J/m² d'UVC par le test des comètes en conditions neutres. Les histogrammes représentent la moyenne (\pm s.e.m) des moments de la queue obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

Le test des comètes en conditions neutres est limité par sa sensibilité (Olive & Banáth 2006). En effet, dans ce cas, les queues des comètes sont beaucoup plus courtes que celles observées en conditions alcalines à cause des conditions d'électrophorèse. Par conséquent, par rapport au test des comètes en conditions alcalines, les différences entre les échantillons traités et leur contrôle peuvent être plus subtiles et les erreurs standards plus importantes.

Par ailleurs, étant donné que les conditions d'électrophorèse du test des comètes varient selon les conditions neutres ou alcalines (voir Matériel et Méthodes), je ne pouvais pas comparer la moyenne des moments des queues obtenue pour chaque condition afin de distinguer les CSB des CDB. De plus, j'ai observé une hétérogénéité dans la formation des cassures au sein des populations cellulaires exposées aux UVC (Figure 48). Par conséquent, l'expression des résultats en termes de moyenne des moments de la queue peut masquer des résultats significatifs. J'ai donc proposé une nouvelle stratégie pour analyser le test des comètes.

Le logiciel que nous disposons au laboratoire évalue, pour chaque comète analysée, son contenu en ADN en plus de son moment de la queue. Afin de prendre en compte l'hétérogénéité de chaque échantillon, j'ai décidé de représenter le moment de la queue de chaque comète en fonction de son contenu en ADN (voir Figure 51). A partir du graphique obtenu pour le contrôle non traité, j'ai décidé de définir une fenêtre selon le même principe que l'analyse de données de cytométrie de flux afin de déterminer un pourcentage de « comètes avec queue ».

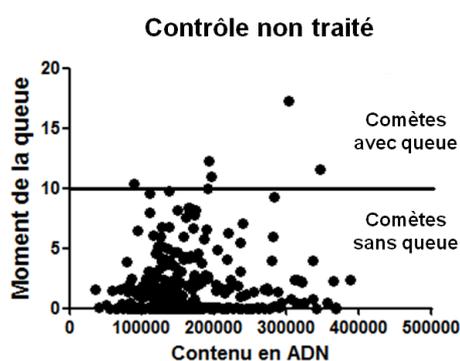


Figure 51. Représentation individuelle de chaque comète par le moment de la queue en fonction du contenu en ADN. La fenêtre représentée par le trait horizontal me permet de définir le pourcentage de « comètes avec queue ».

J'ai obtenu, par cette méthodologie, les pourcentages de comètes avec queue pour chaque condition testée (Figure 52). L'ensemble des résultats est représenté dans le graphique de la Figure 53.

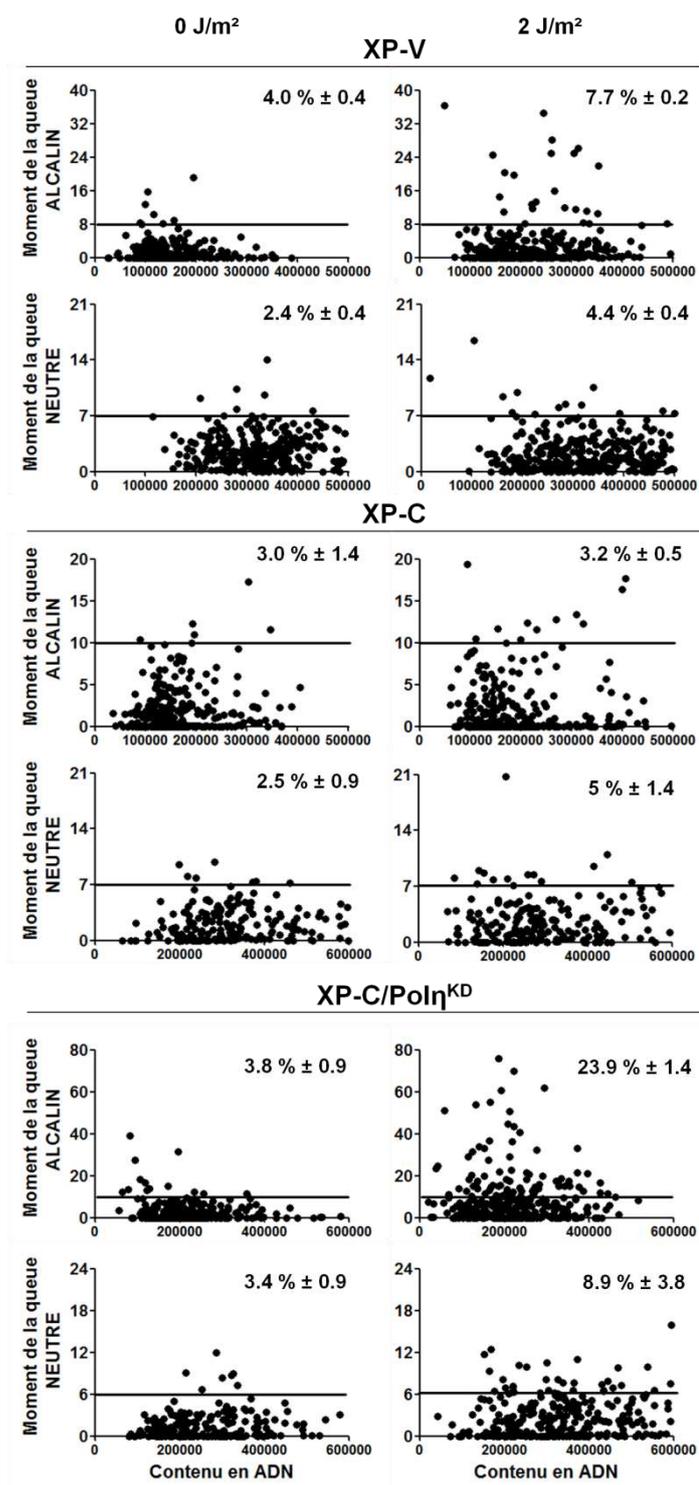


Figure 52. Détermination du pourcentage de comètes avec queue détectées par le test des comètes en conditions alcalines et neutres 24 heures après exposition à 2 J/m². Pour chaque contrôle non irradié, j'ai défini une fenêtre (représentée par le trait horizontal) sur le graphique des moments de la queue en fonction du contenu en ADN. Cette fenêtre est transposée sur le graphique correspondant obtenu en présence de traitement afin de définir le pourcentage de « comètes avec queue ». Les graphiques montrés sont représentatifs et les moyennes (± s.e.m) de 2 expériences individuelles en triplicata sont indiquées.

Tout d'abord, il a été important de vérifier si j'avais obtenu avec ma nouvelle méthodologie des résultats comparables à ceux obtenus avec les moyennes des moments de la queue. Et, effectivement, j'ai obtenu les mêmes résultats d'un point de vue qualitatif, à la fois pour le test des comètes alcalin et neutre (Figure 53 comparée aux Figures 49 et 50). Même si au sein d'une même comète je ne pouvais pas évaluer la part de CSB et de CDB, je pouvais dorénavant mieux comparer les deux conditions du test des comètes étant donné que les résultats ne seront plus exprimés en fonction de la longueur de la queue mais en pourcentage de comètes avec queue.

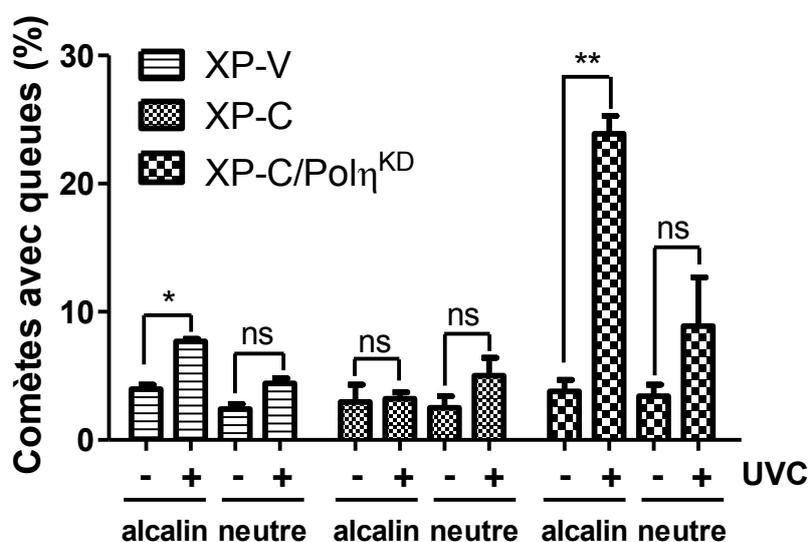


Figure 53. Quantification du pourcentage de comètes avec queue 24 heures après 2 J/m² d'UVC. Les pourcentages de comètes avec queue déterminés en présence ou en absence d'exposition aux UVC et obtenus en conditions alcalines ou neutres sont indiqués. Les significativités des différences entre 0 et 2 J/m² pour les cellules XP-V et XP-C/Polη^{KD} sont indiquées (*P < 0,05; **P < 0,01).

Les Figures 52 et 53 montrent que, 24 heures après 2 J/m² d'UVC, près de 8% des cellules XP-V avaient des queues en conditions alcalines (contre 4% des cellules non traitées), alors que seulement 4% de ces cellules ont présenté des CDB détectées par le test des comètes en conditions neutres (par rapport à 2,4% de cellules non irradiées). Cela signifie que la plupart, si non la totalité, des cassures induites par les UV dans les cellules XP-V correspondent à des CSB. Dans le cas des cellules XP-C/Polη^{KD} irradiées, j'ai détecté 24% des comètes avec queue dues à la formation à la fois de CSB et CDB (contre 4% des cellules non traitées), et 9% de comètes avec queue en conditions neutres, comparé à 3,4% de comètes avec queue en absence d'exposition. Ainsi, une faible dose d'UVC a induit des CSB dans les deux lignées cellulaires et ce,

de façon plus prononcée dans les fibroblastes déficients à la fois en XPC et en Pol η . De plus, dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD}, l'exposition aux UV a également conduit à la formation de CDB.

Par ailleurs, la représentation des moments de la queue en fonction du contenu en ADN (entre 2N et 4N chromosomes, même si la valeur absolue du contenu en ADN estimée par le logiciel peut varier d'une lame à autre) permet en plus d'estimer dans quelle phase du cycle se trouvent les comètes avec queue. Dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD} irradiées, les comètes avec queue en conditions alcalines ont présenté, pour la plupart, un contenu en ADN entre 2N et 4N, ce qui peut être interprété comme des cassures de l'ADN en phase S du cycle cellulaire (Figure 52). Cette interprétation des résultats suggère qu'en réponse à une exposition à une faible dose d'UVC, des CSB sont formées pendant la réplication de l'ADN.

Etant donné que la formation de CSB peut refléter la présence d'ADN simple-brin (ADNsb) sur le brin d'ADN complémentaire, j'ai décidé d'évaluer si l'histone H2AX était phosphorylée au niveau des sites endommagés par exposition aux UVC marqués avec la protéine de réplication A (RPA), qui se fixe sur l'ADNsb (Figure 54). J'ai observé, 7 heures après une irradiation locale aux UVC, que le marquage γ H2AX a co-localisé avec celui de RPA dans les cellules XP-V et XP-C/Pol η ^{KD} mais aussi, de façon surprenante, dans les cellules XP-C⁺ et XP-C, pour lesquelles je n'avais pas détecté des CSB.

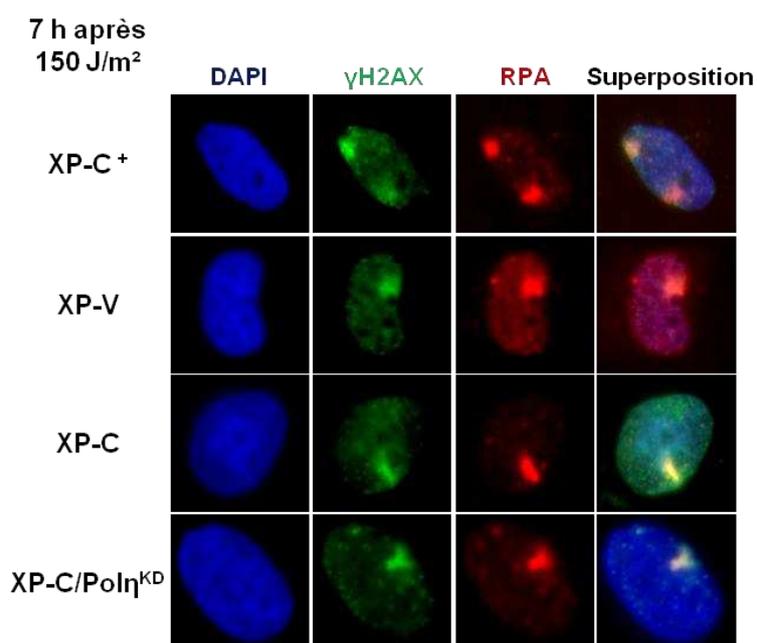


Figure 54. Co-localisation de γ H2AX et RPA 7 heures après irradiation locale à 150 J/m².

L'ensemble de ces résultats indique que dans les cellules XP-C, l'exposition aux UVC a induit la formation de γ H2AX sur les sites d'ADNsb comme pour les cellules XP-V et XP-C/Pol η ^{KD}. Cependant, dans ces deux lignées, j'ai également détecté des CSB. De plus, uniquement dans les cellules déficientes à la fois en NER et en Pol η , l'irradiation a provoqué en plus des CDB.

2.2.4 Effets de la caféine sur les cellules déficientes en XPC et/ou Pol η exposées à une faible dose d'UVC

2.2.4.1 La caféine induit l'arrêt de la réplication et la fragmentation de l'ADN des cellules XP-V, XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} irradiées aux UVC

Nous avons observé que la caféine sensibilisait les cellules XP-V, XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} exposées à 2 J/m² d'UVC (Figures 35 et 36). Et, j'ai décidé de rechercher l'effet de la caféine sur les réponses aux dommages provoqués par les rayons UVC mises en évidence jusqu'à présent dans nos cellules.

La Figure 55 montre les conséquences de l'addition de la caféine dans la distribution des cellules irradiées à 2 J/m² dans les phases du cycle cellulaire, à différents temps après le traitement. Globalement, la caféine n'a pas altéré le cycle cellulaire en absence d'exposition aux UVC. De plus, les cellules XP-C⁺ n'ont présenté aucune modification de leur cycle cellulaire, et un effet sur la répartition des cellules déficientes dans les phases du cycle n'a été détecté qu'à partir de 24 heures après le traitement (Figure 55).

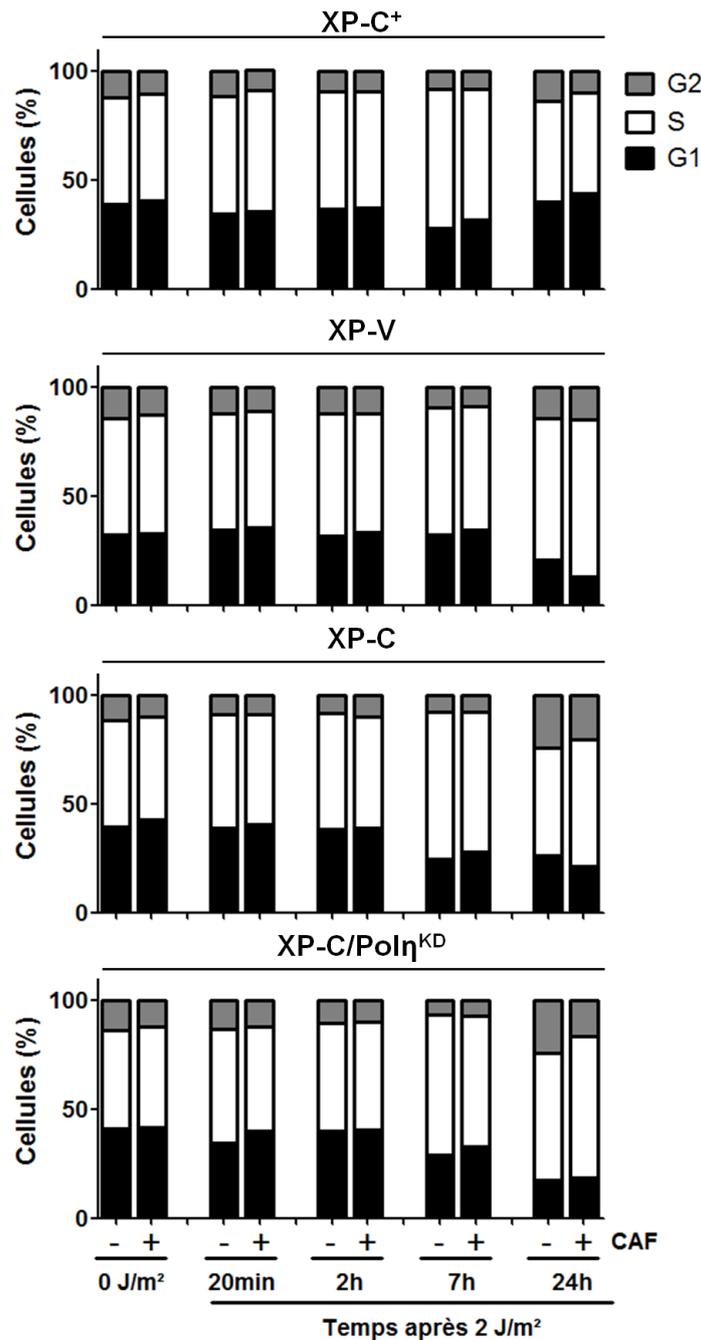


Figure 55. Distribution dans les phases du cycle cellulaire des cellules XP-C⁺, XP-V, XP-C et XP-C/Polη^{KD} à différents temps après 2 J/m² en présence ou en absence de caféine (CAF). Les histogrammes représentent la moyenne des pourcentages de cellules dans chaque phase du cycle obtenus à partir du co-marquage de BrdU et du contenu en ADN réalisé au moins 2 fois de façon indépendante.

Comme attendu, les cellules XP-V se sont accumulées en début de phase S du cycle cellulaire et ont présenté une incorporation hétérogène de BrdU, ce qui indique que les fourches de réplication ont été bloquées 24 heures après le traitement (Figure 56). D'un autre côté, les cellules XP-C se sont accumulées à la fin de phase de

réplication de l'ADN et ont également présenté des fourches de réplication bloquées. Enfin, les fibroblastes XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$, se sont accumulés en début de phase S comme les cellules XP-V, et ont présenté également une perturbation beaucoup plus drastique de la réplication (Figures 55 et 56).

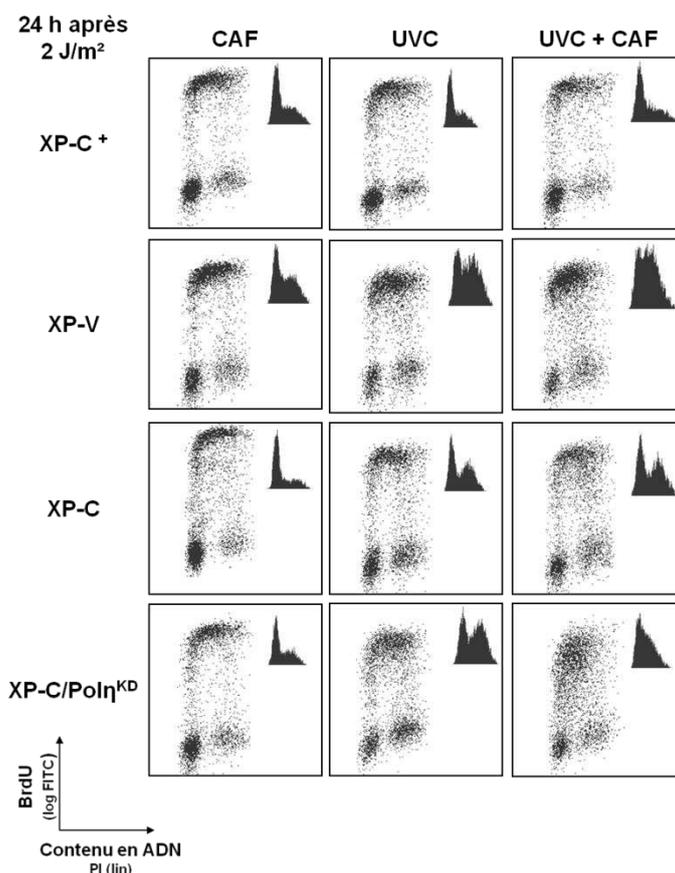


Figure 56. Cycles cellulaires des fibroblastes XP-C⁺, XP-V, XP-C et XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ 24 heures après l'exposition à 2 J/m² en présence ou en absence de caféine (CAF). Cette expérience a été faite 3 fois et des graphiques représentatifs sont montrés. En haut à droite de chaque graphique, la distribution correspondante des cellules dans les phases du cycle observée uniquement par le marquage du contenu en ADN par PI est indiquée.

Par ailleurs, 72 heures après le traitement avec UVC + caféine, la fraction de cellules en Sub-G1 a été significativement plus importante dans les trois lignées cellulaires déficientes par rapport à une exposition aux UVC uniquement (Figure 57). En effet, 28% des cellules XP-V ont présenté un matériel génétique fragmenté et 33% des cellules XP-C se sont accumulées en Sub-G1. En accord avec les effets prononcés de ce traitement sur le cycle cellulaire des cellules XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$, la fraction de Sub-G1

a été plus importante pour cette lignée avec près de 41% des cellules avec une fragmentation de l'ADN (Figure 57).

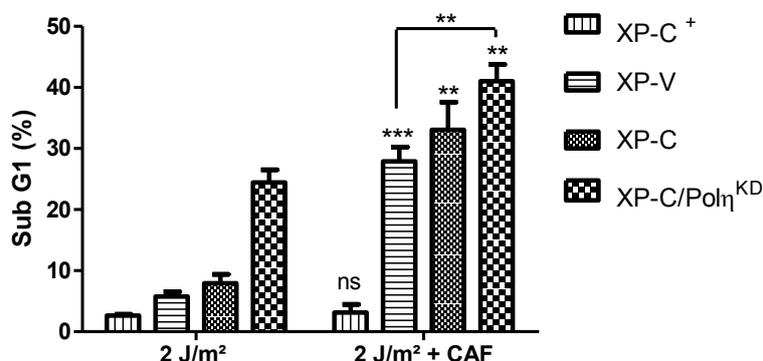


Figure 57. Quantification de la fraction de cellules en Sub-G1 72 heures après exposition à 2 J/m² en présence ou en absence de caféine (CAF). Les histogrammes représentent les moyennes (\pm s.e.m.) de 3 expériences individuelles. Les significativités des différences entre l'exposition aux UVC avec et sans CAF sont indiquées (ns, non significatif ; **P < 0,01; ***P < 0,001).

De plus, j'ai vérifié que le traitement concomitant UVC + caféine était létal pour les trois lignées cellulaires déficientes, comme l'indique l'analyse de prolifération cellulaire 6 jours après (Figure 58).

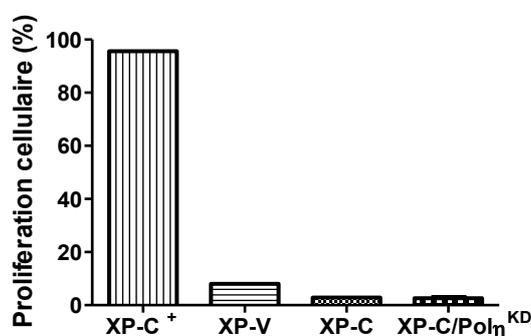


Figure 58. Prolifération des fibroblastes XP-C⁺, XP-V, XP-C et XP-C/Polη^{KD} 6 jours après l'exposition à 2 J/m² d'UVC en présence de caféine. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle non irradié.

En résumé, la caféine a fortement perturbé la réplication de l'ADN et a induit une fragmentation prononcée du matériel génétique des fibroblastes XP-V, XP-C et XP-C/Polη^{KD} irradiés aux UVC.

2.2.4.2 La caféine induit des niveaux élevés de γ H2AX et des cassures de l'ADN dans les fibroblastes déficients en XPC et/ou Pol η exposés à une faible dose UVC

Pour approfondir le mécanisme par lequel les cellules XP-C, XP-V et XP-C/Pol η ^{KD} exposées aux UVC sont sensibilisées par la caféine, j'ai étudié la phosphorylation de H2AX, ainsi que la formation de CSB et CDB après ce traitement.

La Figure 59 montre la quantification du pourcentage de cellules positives pour le marquage de γ H2AX détecté par cytométrie de flux en absence ou en présence de caféine à différents temps après irradiation à 2 J/m² d'UVC. Le traitement à la caféine n'a eu aucun effet sur la formation de γ H2AX dans les cellules irradiées XP-C⁺, mais, par contre, il a provoqué une augmentation du marquage de γ H2AX à partir de 24 heures après exposition aux UVC dans les trois lignées cellulaires déficientes (Figure 59). Cette augmentation de la proportion de cellules positives pour γ H2AX a été nettement plus prononcée dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD} 24 heures et surtout 72 heures après traitement UVC + caféine que dans les autres lignées cellulaires déficientes.

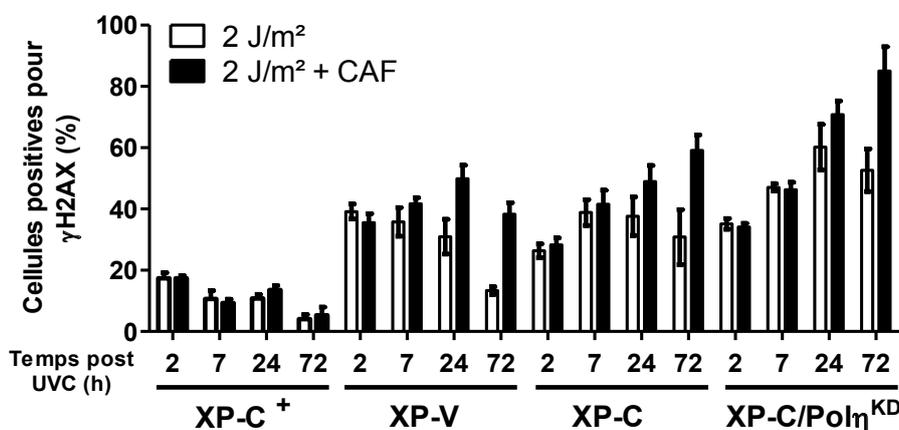


Figure 59. Quantification du pourcentage de cellules positives pour γ H2AX à différents temps après exposition 2 J/m² en présence ou en absence de caféine (CAF). Les histogrammes représentent les moyennes (\pm s.e.m.) des pourcentages de cellules γ H2AX+ détectées par cytométrie de flux trois fois de façon indépendantes.

Par ailleurs, grâce au marquage des foyers γ H2AX par immunofluorescence dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD} (Figure 60), j'ai constaté que le traitement UVC + caféine a augmenté, de façon significative, la quantité de cellules présentant un marquage intense et homogène au sein de leur noyau. Ce marquage de γ H2AX, appelé pan-nucléaire par Cleaver et coll. (Marti et al. 2006; Cleaver 2011), a été associé par cette équipe aux niveaux élevés de γ H2AX détectés par cytométrie de flux (de Feraudy et al. 2010).

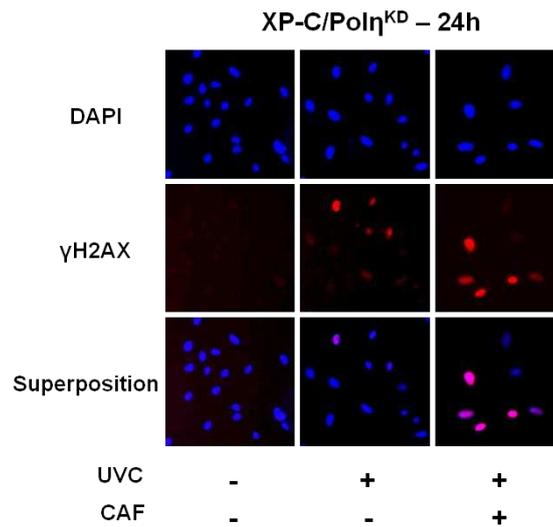


Figure 60. Immunofluorescence des foyers γ H2AX 24 heures après exposition à 2 J/m² en présence ou en absence de caféine (CAF) dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD}. Le marquage homogène plus intense correspond à un marquage pan-nucléaire de γ H2AX.

J'ai ensuite étudié le marquage de γ H2AX en fonction du contenu en ADN par cytométrie de flux (Figure 61). Et, j'ai constaté que la présence de caféine a entraîné des niveaux élevés de γ H2AX dans les cellules XP-C et XP-V. De plus, ce traitement a augmenté la quantité de cellules XP-C/Pol η ^{KD} présentant ce marquage plus intense de la forme phosphorylée de l'histone, ce qui a confirmé mon observation par immunofluorescence (Figure 60).

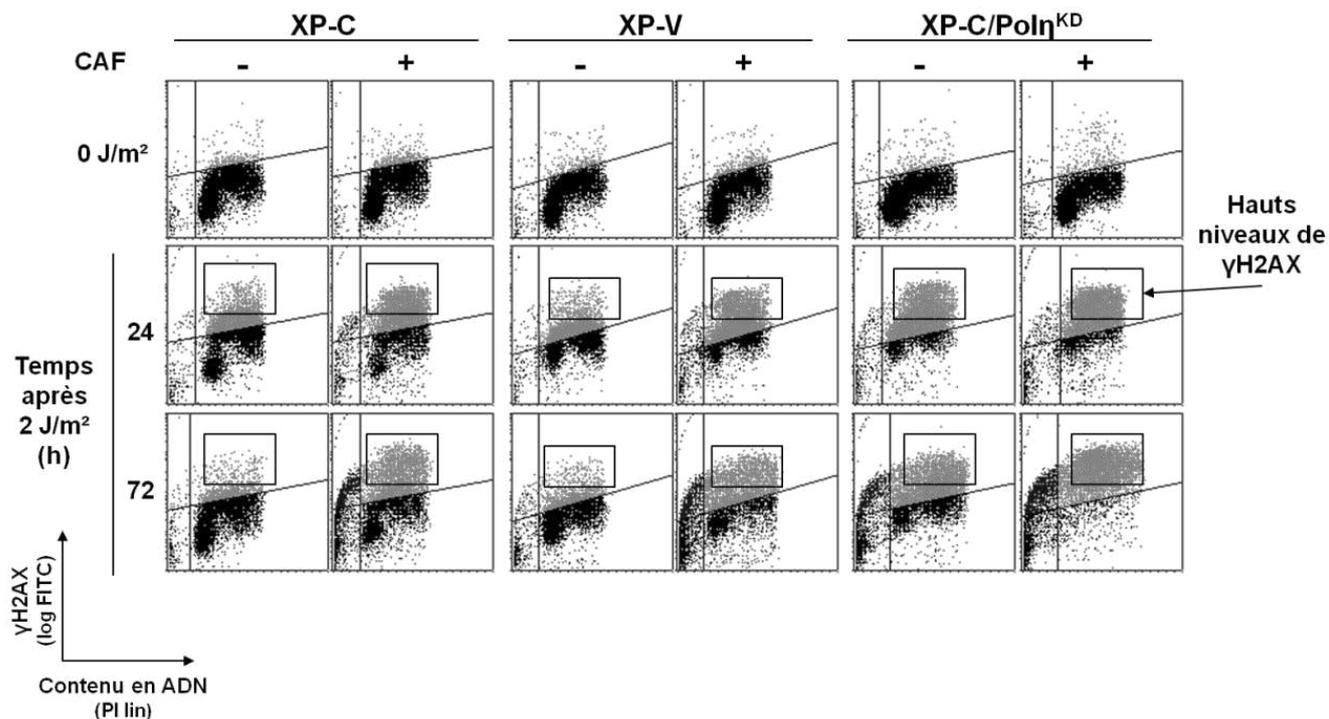


Figure 61. Formation de γ H2AX en fonction des phases du cycle cellulaire 24 et 72 heures après exposition à 2 J/m² en présence ou en absence de caféine (CAF). Des fenêtres ont été définies, pour chaque lignée, 24 heures après UVC en absence de CAF, à partir desquelles j'ai évalué les pourcentages de cellules avec des niveaux élevés de γ H2AX (« hauts niveaux de γ H2AX »). Des graphiques représentatifs de 3 expériences individuelles sont montrés.

Pour aller plus loin, j'ai décidé de quantifier le pourcentage de cellules présentant des niveaux élevés de γ H2AX. Dans ce but, pour chaque lignée cellulaire déficiente, j'ai défini une fenêtre à partir du graphique obtenu 24 heures après l'exposition à 2 J/m² en absence de caféine qui correspondait à la condition basale pour la formation des niveaux élevés de γ H2AX (Figure 61). Et, cette même fenêtre a été appliquée aux autres conditions, ce qui m'a permis d'obtenir des pourcentages comparables de cellules présentant des niveaux élevés de γ H2AX pour chaque condition et chaque lignée cellulaire. Il est à noter que seules les cellules vivantes ont été prises en compte, celles en Sub-G1 ont été exclues de cette quantification. La Figure 62 indique les résultats des quantifications des cellules présentant des niveaux élevés de γ H2AX (« hauts niveaux de γ H2AX », représentées par la partie grise des histogrammes) par rapport à la totalité de cellules positives pour γ H2AX (partie grise + partie blanche des histogrammes).

Et, nous pouvons observer clairement que l'augmentation de la fraction de cellules positives pour γ H2AX provoquée par la caféine est principalement attribuable à l'induction de niveaux élevés de γ H2AX dans les cellules XP-V, XP-C et XP-C/Polη^{KD}

exposées à 2 J/m² (Figure 62). Par exemple, pour les cellules XP-C, l'exposition aux UV a induit 33% de cellules positives pour γ H2AX, dont 3% présentaient de niveaux élevés de γ H2AX.

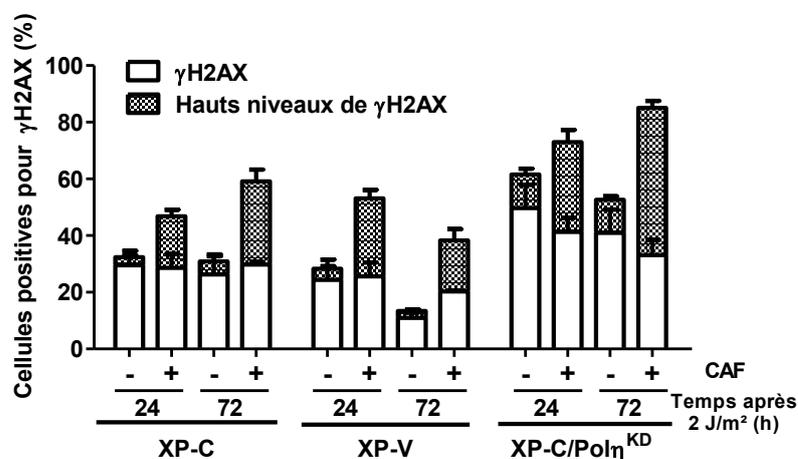


Figure 62. Quantification de cellules présentant des niveaux élevés de γ H2AX (gris) par rapport à la totalité des cellules positives pour γ H2AX (gris + blanc) 24 et 72 heures après exposition à 2 J/m² en présence ou en absence de caféine (CAF). Les histogrammes représentent les moyennes (\pm s.e.m.) de trois expériences réalisées de façon indépendante.

En présence de caféine, 48% des cellules étaient positives pour γ H2AX, dont 18% présentaient de niveaux élevés de γ H2AX, c'est-à-dire que 30% des cellules positives ne présentaient pas de niveaux élevés de γ H2AX, ce qui représente le même pourcentage de cellules positives pour γ H2AX en absence de caféine. Par conséquent la seule différence selon la présence ou absence de caféine dans les cellules irradiées a été l'induction de niveaux élevés de γ H2AX (Figure 62). Ceci est en accord avec des données publiées par Cleaver et coll. (de Feraudy et al. 2010).

Ensuite je me suis demandée si les niveaux élevés de γ H2AX étaient dépendants du cycle cellulaire. À partir du contenu en ADN, j'ai de nouveau déterminé le marquage de γ H2AX en fonction des différentes phases du cycle (Figure 63). De façon comparable à ce que j'avais déjà observé pour les cellules XP-C/Pol η ^{KD} irradiées aux UVC en absence de caféine, 24 heures après UVC + caféine, les cellules XP-C, XP-V et XP-C/Pol η ^{KD} présentant des niveaux élevés de γ H2AX ont été détectées principalement en phases S et G2. Néanmoins, j'ai également observé une fraction de cellules avec ce marquage plus intense de γ H2AX en phase G1, bien qu'elles aient été minoritaires par rapport à celles dans les autres phases (Figure 63). Par ailleurs, 72 heures après le traitement concomitant UVC + caféine, le profil de marquage de γ H2AX dans les cellules XP-C et XP-V était comparable à celui observé 24 heures après le traitement,

alors que la totalité des cellules XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ présentait des niveaux élevés de γH2AX (Figure 63).

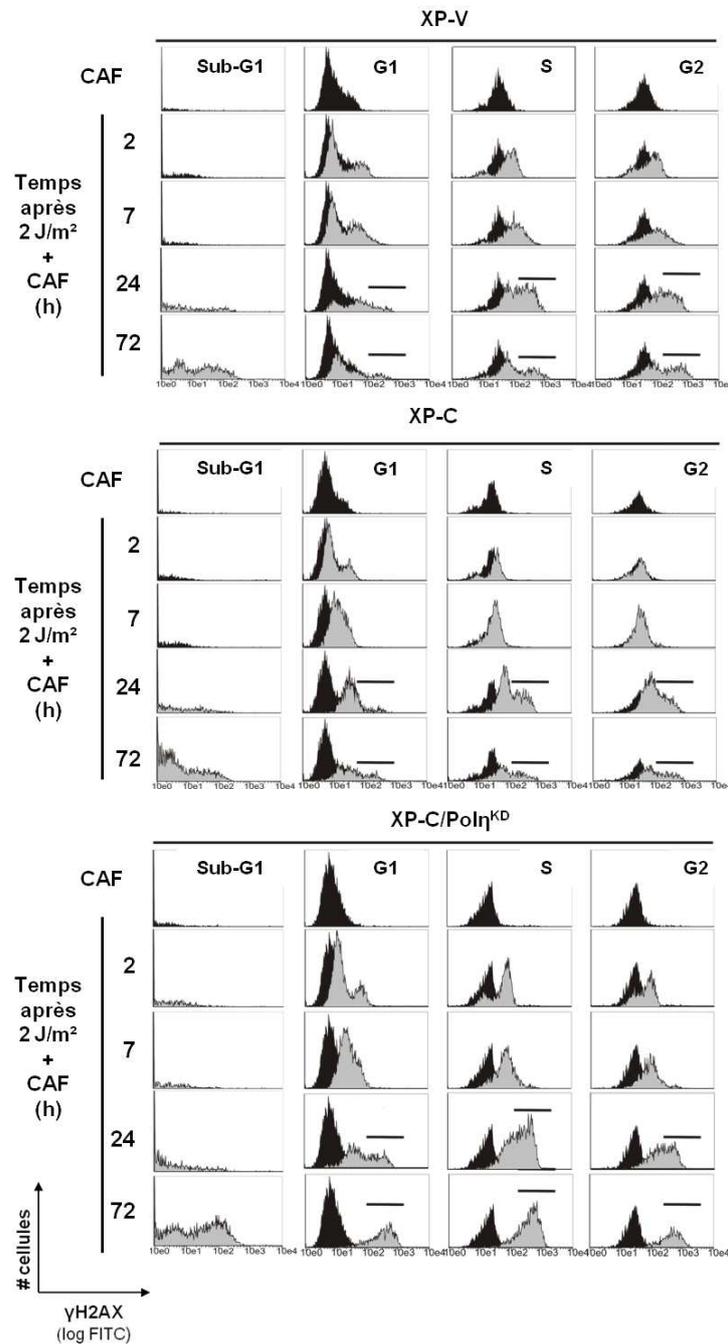


Figure 63. Distribution des cellules marquées pour γH2AX dans les phases du cycle cellulaire, à différents temps après irradiation aux UVC en présence de caféine (CAF). Les graphiques obtenus uniquement avec CAF sont en noir et ceux obtenus 2, 7, 24 ou 72 heures après UV+CAF sont représentés en gris. Des graphiques représentatifs d'au moins 2 expériences individuelles sont montrés. Les barres horizontales en gras indiquent les niveaux élevés de γH2AX .

Il est intéressant de noter que, pour les trois lignées cellulaires, les cellules en Sub-G1 ont présenté un marquage hétérogène de γ H2AX, ce qui nous empêche de faire directement une corrélation entre le marquage de γ H2AX et la fragmentation de l'ADN (Figures 61 et 63).

Ensuite, je me suis intéressée à la formation de cassures de l'ADN en réponse au traitement UVC + caféine. De façon intéressante, par le test des comètes en conditions alcalines, j'ai observé une augmentation des cassures de l'ADN par ce double traitement en comparaison à l'exposition aux UVC uniquement dans les cellules XP-V et XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$, bien que ce résultat ait été plus prononcé dans ces dernières (Figures 64 et 65). Il faut souligner que, dans les cellules XP-C, ce traitement a provoqué la formation des cassures de l'ADN, alors que celles-ci n'avaient pas été détectées après une exposition à 2 J/m^2 sans caféine (Figure 65).

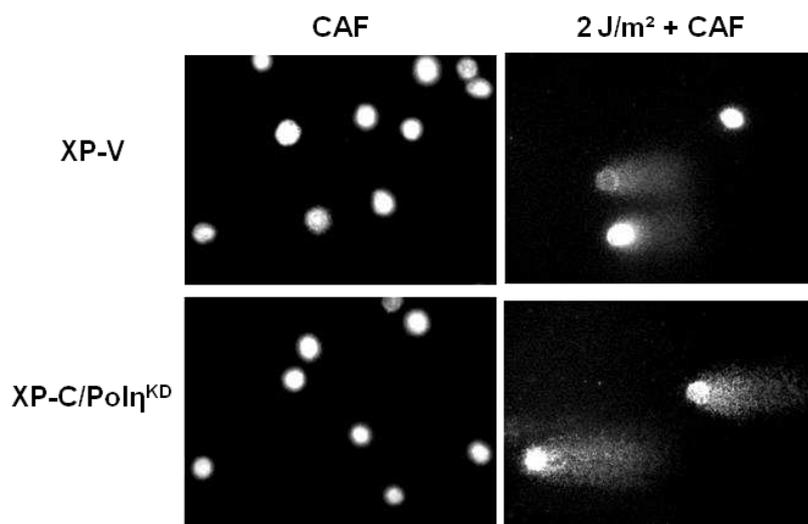


Figure 64. Visualisation des comètes en conditions alcalines 24 heures après exposition à 2 J/m^2 d'UVC en présence de caféine (CAF).

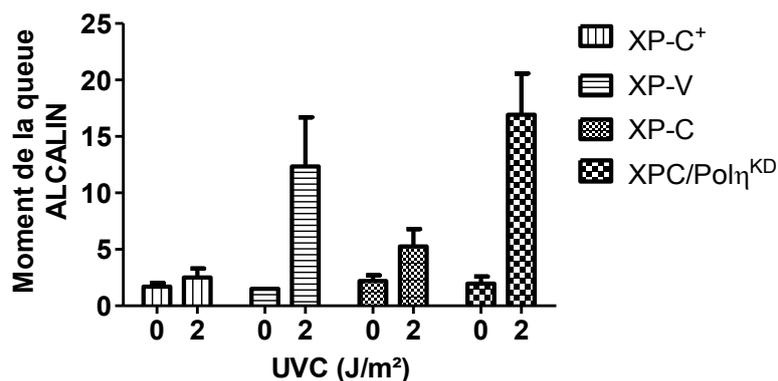


Figure 65. Détection de cassures de l'ADN 24 heures après exposition aux UVC en présence de caféine (CAF) par le test des comètes en conditions alcalines. Les histogrammes représentent la moyenne (\pm s.e.m) des moments de la queue obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

Le test des comètes en conditions neutres a montré que la caféine a provoqué des CDB de l'ADN dans les lignées cellulaires déficientes irradiées aux UVC (Figure 66).

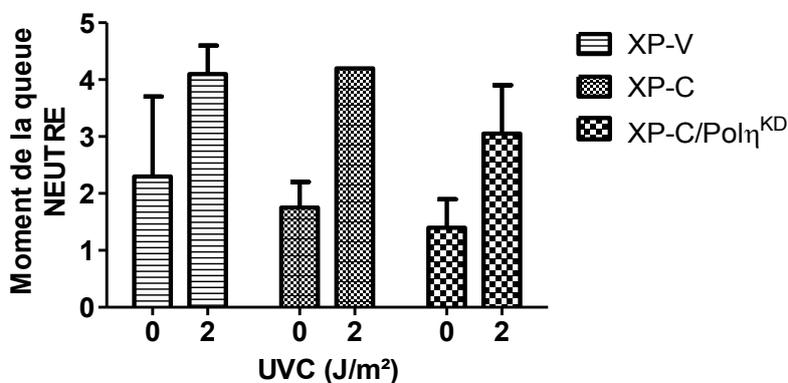


Figure 66. Détection de cassures double-brin de l'ADN 24 heures après exposition aux UVC en présence de caféine (CAF) par le test des comètes en conditions neutres. Les histogrammes représentent la moyenne (\pm s.e.m) des moments de la queue obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

Afin de distinguer entre les CSB et CDB de l'ADN provoquées par le double traitement UVC + caféine, j'ai évalué, pour chaque condition, le pourcentage de comètes avec queue selon la même méthodologie que celle décrite précédemment dans ce manuscrit. L'analyse est représentée dans la Figure 67 et les résultats sont regroupés dans le graphique de la Figure 68.

A 24 heures post UVC + caféine, les cellules XP-V ont présenté 2,6 fois plus de comètes avec queues en conditions alcalines qu'en conditions neutres. De même, dans les cellules XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$, les comètes avec queue détectées en conditions alcalines ont été près de 3 fois plus importantes que celles observées en conditions neutres (Figures 67 et 68).

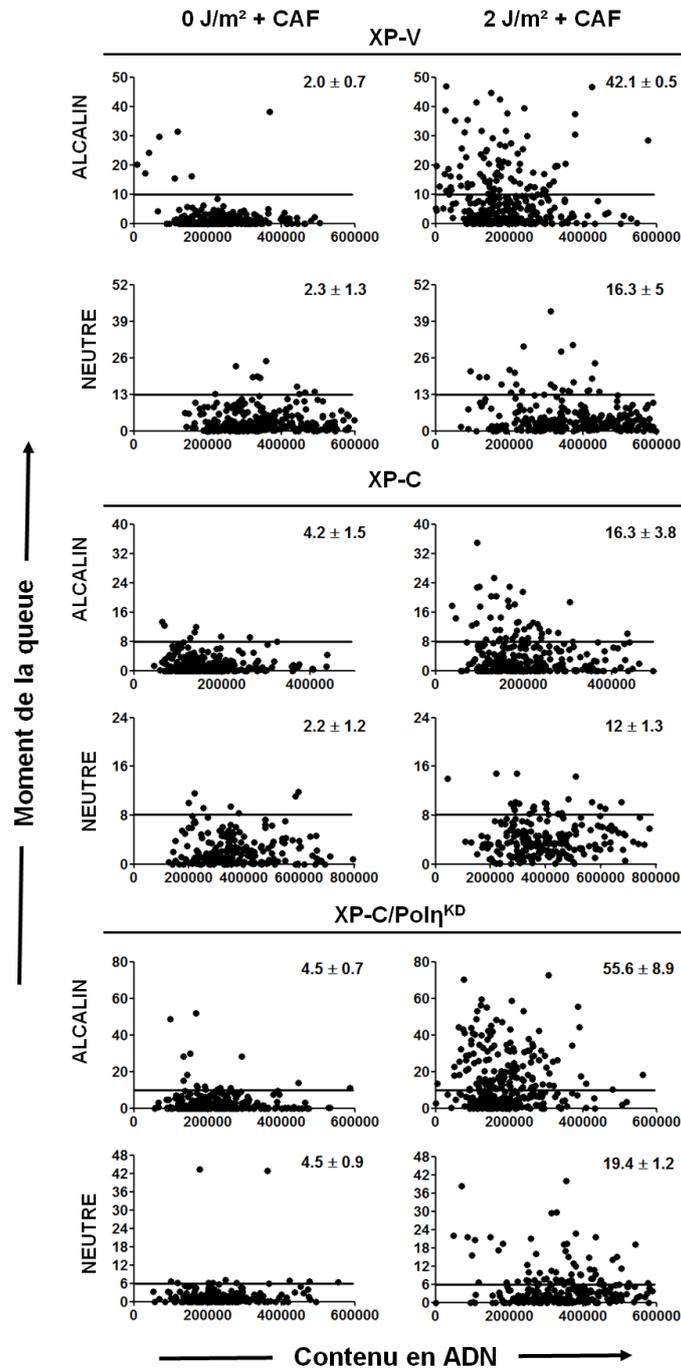


Figure 67. Détermination du pourcentage de comètes avec queue détectées par le test des comètes en conditions alcalines et neutres 24 heures après exposition à 2 J/m² en présence de caféine. Les graphiques montrés sont représentatifs et les moyennes (\pm s.e.m) de 2 expériences individuelles en triplicata sont indiquées en pourcentage.

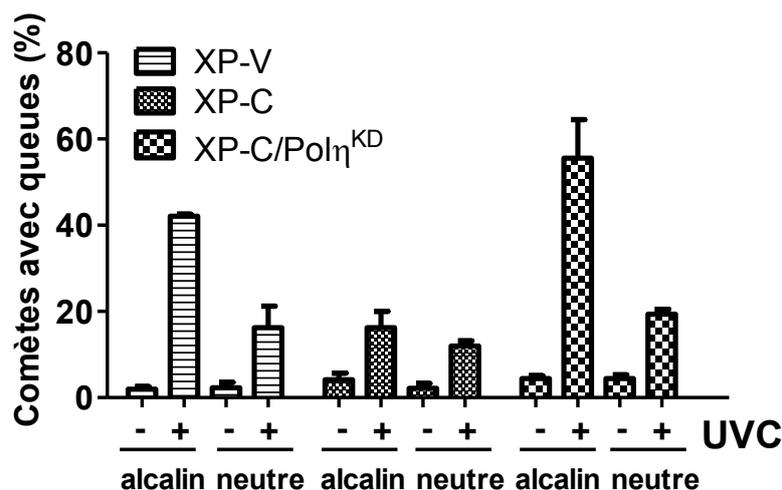


Figure 68. Quantification du pourcentage de comètes avec queue 24 heures après 2 J/m² d’UVC en présence de caféine (CAF). Les pourcentages de comètes avec queue déterminés en présence ou en absence d’exposition aux UVC et obtenus en conditions alcalines ou neutres sont indiqués.

Ces résultats indiquent que dans les cellules XP-V et XP-C/Polη^{KD} irradiées, la caféine a provoqué majoritairement des CSB. Cependant, en ce qui concerne les cellules XP-C, j’ai observé que les pourcentages de comètes avec queue détectées en conditions alcalines et neutres n’étaient pas significativement différents (16 et 12% respectivement). Par conséquent, en réponse à l’exposition aux UV, dans les cellules XP-V, la caféine a augmenté la génération de CSB et provoqué la formation de CDB alors que dans les cellules XP-C/Polη^{KD}, la caféine a augmenté à la fois les CSB et CDB. Et, dans les cellules XP-C irradiées, la caféine a provoqué des CDB.

En résumé, la caféine a exacerbé les effets de l’exposition à une faible dose d’UVC dans les cellules XP-C/Polη^{KD}, tels que l’arrêt de la réplication, la formation de niveaux élevés de γH2AX et la formation de cassures de l’ADN. Dans les cellules XP-V, la caféine a également augmenté l’effet de l’exposition aux UV sur la réplication et sur la formation de CSB d’une part, et d’autre part, elle a induit des niveaux élevés de γH2AX ainsi que des CDB. D’un autre côté, la caféine a provoqué ces mêmes effets dans les cellules XP-C irradiées, alors qu’ils n’avaient pas été observés en absence de caféine. Enfin, dans les trois lignées cellulaires déficientes, la caféine a conduit à une mort cellulaire significative.

II) La protéine XPA et l'ADN polymérase η sont nécessaires pour la réparation des lésions de l'ADN induites par la doxorubicine

Jusqu'à présent, je me suis intéressée aux conséquences cellulaires et moléculaires de la déficience en protéines XPC et/ ou Pol η en réponse à une exposition aux UV. Dans cette partie du manuscrit, j'aborderai l'étude que nous avons réalisée avec des cellules déficientes en NER et en ADN Polymérase η traitées avec un agent chimiothérapeutique, la doxorubicine. L'ensemble du travail a récemment fait l'objet d'une publication dont je suis deuxième auteur dans le journal Cancer Letters (présenté intégralement en annexe), excepté des données préliminaires obtenues à partir du clone stable XP-C/Pol η ^{KD}.

Depuis plus de quarante ans, la doxorubicine (DOX) (nom commercial, Adriamycine ®), un antibiotique de type anthracycline, est largement utilisée dans le traitement chimiothérapeutique de différentes tumeurs. Néanmoins, malgré son utilisation clinique en routine, les mécanismes d'action de la DOX ne sont pas encore tout à fait connus. Le mode d'action le mieux caractérisé est l'inhibition de l'enzyme topoisomérase-II (topo-II), qui conduit à la formation de cassures double-brin (CDB) de l'ADN. Cependant, d'autres dommages peuvent jouer un rôle dans la cytotoxicité induite par la DOX, tels que la formation d'adduits d'ADN et de ponts inter- ou intra-brin de l'ADN, ainsi que la production de radicaux libres. Puisque la nature de toutes les lésions de l'ADN induites par la DOX n'est pas encore élucidée, les voies de réparation impliquées dans la réponse à la DOX restent à être identifiées.

Il a été montré que la protéine kinase DNA-PKcs, une des protéines clé de la voie NHEJ, participe à la réponse aux lésions de l'ADN induites par la DOX, probablement via la réparation des CDB provoquées par l'inhibition de la topo-II. Une autre voie qui semble être impliquée dans la réparation des dommages induits par la DOX est la NER. En effet, des travaux antérieurs ont montré que les cellules issues de patients XP et déficientes en protéine XPA, XPC (Carvalho et al. 2010) ou XPD (Saffi et al. 2010) sont plus sensibles au traitement à la DOX, ce qui suggère un rôle de ces protéines dans la réparation des lésions induites par cet agent génotoxique.

Afin de mieux comprendre l'implication des protéines XP dans la réparation des lésions induites par la DOX, des fibroblastes déficients en XPA, XPF ou Pol η (cellules XP-V) ont été traités à des doses cliniques de DOX et plusieurs réponses cellulaires aux dommages ont été analysées.

1. Les cellules XP-A et XP-V sont plus sensibles que les cellules sauvages au traitement à la DOX

Afin d'évaluer la cytotoxicité induite par la DOX dans les fibroblastes XP-A, XP-F et XP-V, nous avons analysé la prolifération et la mort cellulaire en réponse à ce traitement.

Tout d'abord, nous avons observé que les cellules MRC5, XP-A et XP-V ont présenté une diminution dose-dépendante de leur prolifération 48 heures après le début du traitement (Figure 1, article II en annexe). Néanmoins, la multiplication des cellules déficientes a été significativement plus altérée que celle des cellules MRC5 et de façon plus prononcée dans les cellules déficientes en protéine XPA. Ce résultat a été renforcé par l'analyse en temps réel de la prolifération des cellules traitées avec deux doses de DOX par xCelligence system (Figure 3, article II en annexe). De plus, la quantification de la fraction de cellules en Sub-G1 48 heures après traitement a révélé que la DOX a induit la fragmentation de l'ADN des cellules XP-A et XP-V, alors que les cellules XP-F, comme les cellules MRC5, n'ont présenté aucune apoptose induite par la DOX (Figure 1, article II en annexe). Ce résultat a été confirmé grâce à un test au microscope par un marquage permettant de distinguer les cellules viables, les cellules nécrotiques et les cellules en apoptose précoce ou tardive (Figure 2, article II en annexe). L'absence d'effet de la DOX sur les cellules XP-F peut s'expliquer par l'activité résiduelle de la voie NER dans les cellules issues de patients XP-F, qui peut parfois atteindre 30% des niveaux normaux de NER. Ainsi, cette activité résiduelle pourrait être responsable de la réparation des dommages de l'ADN induits par les doses utilisées dans cette étude.

En recoupant les données de prolifération et de mort cellulaire, nous pouvons conclure que les protéines XPA et Pol η sont impliquées dans la réparation des lésions provoquées par des doses cliniques de DOX et que ces protéines sont, par conséquent, essentielles pour la survie des cellules traitées avec cet agent.

2. L'inhibition des PI3K et PIKK par LY294002 potentialise les effets cytotoxiques de la DOX sur les cellules XP-A et XP-V

Dans certaines cellules tumorales, les effets cytotoxiques de la DOX sont renforcés par le LY294002, un inhibiteur de phosphatidylinositol-3-kinases (PI3Ks) et des protéines kinases associées (PIKKs). Étant donné que les protéines kinases impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN, ATM, ATR et DNA-PKcs, sont membres de la famille PIKK, nous avons décidé d'analyser les effets du co-traitement à la DOX et au LY294002 (LY). Nous avons observé que les effets cytotoxiques de la DOX sur les cellules XP-A et XP-V ont été plus importants en présence de LY puisque le co-traitement a induit des niveaux plus élevés d'apoptose que ceux provoqués par un traitement unique à la DOX (Figures 4 et 5, article II en annexe). D'autre part, aucun effet n'a été observé dans les cellules MRC5.

3. Les fibroblastes traités à la DOX sont arrêtés en phase G2 du cycle cellulaire

Étant donné que nous avons observé une diminution significative de la prolifération cellulaire suite à un traitement à la DOX, nous avons décidé d'évaluer les effets de cet agent génotoxique sur le cycle cellulaire des cellules MRC5, XP-A et XP-V. La quantification de la fraction de cellules dans chaque phase du cycle détectée par cytométrie de flux nous a montré que le traitement à la DOX a induit un arrêt du cycle en phase G2 dans les cellules XP-A et XP-V, mais aussi dans les cellules MRC5 (Figure 6, article II en annexe). Par ailleurs, l'addition de LY a provoqué un arrêt encore plus prononcé que celui en réponse à un traitement unique à la DOX dans les trois lignées cellulaires traitées. De façon surprenante, les cellules MRC5 co-traitées à la DOX et au LY ont présenté un arrêt en phase G2 plus important que celui observé pour les cellules XP-A et XP-V. Cela est probablement dû à l'activité de la voie NER des cellules MRC5, qui permettrait l'activation plus efficace des points de surveillance appropriés, évitant ainsi la mort cellulaire.

4. La DOX induit la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2AX (formation de γ H2AX)

La DOX est considérée comme un inhibiteur de la topo-II et elle peut conduire ainsi à la formation de CDB de l'ADN. En effet, des études antérieures ont montré que les cellules traitées à la DOX présentent des CDB, mises en évidence par le test des comètes et la phosphorylation de la sérine 139 des histones H2AX (γ H2AX) (Saffi et al. 2010). Cette modification post-traductionnelle des histones H2AX est normalement responsable du remodelage de la chromatine dans la région des CDB, permettant l'accès de la machinerie de réparation à ces dommages. Bien que nous ne pensions pas que la protéine XPA soit impliquée dans la réparation des CDB, Pol η pourrait jouer un rôle dans la protection de la cellule contre ce type de lésion. J'ai donc quantifié par cytométrie de flux les niveaux de γ H2AX en fonction du cycle cellulaire (Figure 7, article II en annexe). Cette analyse a montré que le traitement à la DOX a induit la formation de γ H2AX pendant au moins 48 heures. De façon intéressante, nous n'avons pas observé de différence entre les cellules MRC5, XP-A et XP-V, bien que l'induction de mort cellulaire accrue (Sub-G1) dans les cellules XP-A et XP-V traitées a été confirmée. L'absence de différence dans le marquage de γ H2AX entre les lignées cellulaires indique que les protéines XPA et Pol η ne sont pas impliquées dans la réponse aux CDB. Par ailleurs, lorsque l'inhibiteur LY a été ajouté aux cellules traitées à la DOX, j'ai observé une augmentation de la fraction de cellules positives pour γ H2AX dans les trois lignées cellulaires étudiées. Ce résultat suggère que, d'une part, les protéines kinases ciblées par le LY contribueraient à réduire le nombre de CDB, et, d'autre part, que l'inhibition des kinases ne diminuerait pas le niveau de phosphorylation de H2AX. L'analyse de la formation de γ H2AX en fonction des phases du cycle cellulaire (Figure 7, article II en annexe) a montré que les cellules marquées sont distribuées dans les différentes phases du cycle cellulaire, avec toutefois un important niveau de γ H2AX dans les cellules en phase G2, qui sont arrêtées en cette phase, comme nous l'avons déjà décrit plus haut.

En recoupant l'ensemble des résultats observés, nous pouvons conclure que les protéines XPA et Pol η sont impliquées dans les réponses aux dommages provoqués par la DOX. Néanmoins, dans ce cas, les lésions en question ne sont pas des CDB.

5. Réduction de l'expression de Pol η dans les cellules XP-A et traitement à la DOX

Récemment, Auclair et coll. ont montré que l'activité de Pol η est importante pour la voie de réparation du génome global pendant la phase S de cellules humaines exposées aux rayons UV (Auclair et al. 2010). Nous nous sommes demandés si, en réponse à un traitement à la DOX, la fonctionnalité de Pol η et de la voie NER seraient également dépendantes l'une de l'autre. Dans ce but, nous avons réduit, de façon transitoire, l'expression de Pol η dans les cellules XP-A au moyen de différentes séquences de shRNA. Et, nous avons évalué la prolifération cellulaire ainsi que l'induction de fragmentation de l'ADN par un traitement à la DOX des cellules XP-A shPOLH comparées aux cellules isogéniques XP-A. Suite à des traitements à la DOX ainsi qu'aux rayons UVC, aucune différence significative n'a été observée entre les cellules XP-A et XP-A shPOLH. L'ensemble de ces résultats est présenté ci-dessous (Figure 69) et en données supplémentaires dans la revue Cancer Letters.

Il est important de noter que les résultats présentés avec les cellules XP-A shPOLH ne sont pas concluants. En effet, nous ne pouvons pas affirmer que l'absence de différence entre les cellules XP-A et XP-A shPOLH ne soit pas simplement due au fait que l'inhibition du gène codant Pol η n'était pas suffisamment efficace d'un point de vue fonctionnel, bien que la réduction de l'expression de la protéine soit visible par western blot (Figure 69 A). Les protéines impliquées dans les réponses aux dommages de l'ADN sont souvent présentes en faibles quantités, et une expression résiduelle pourrait être suffisante pour l'activité de la protéine. Cette hypothèse est renforcée par le fait que nous n'avons pas réussi à observer une différence entre ces cellules en réponse à une exposition aux UVC, alors que celle-ci est significative entre les cellules XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} (Partie I des résultats).

Par ailleurs, dans le cas des traitements induisant des dommages de l'ADN pris en charge par la voie NER, les cellules XP-A sont particulièrement sensibles du fait de leur déficience totale dans cette voie (GGR+TCR). Ceci a été en effet observé en réponse à l'exposition aux UVC et au traitement à la DOX (Figure 69 C). Ainsi, un éventuel effet de l'extinction de l'expression de Pol η dans les cellules déficientes en NER peut être masqué par l'extrême sensibilité des cellules XP-A à ces traitements.

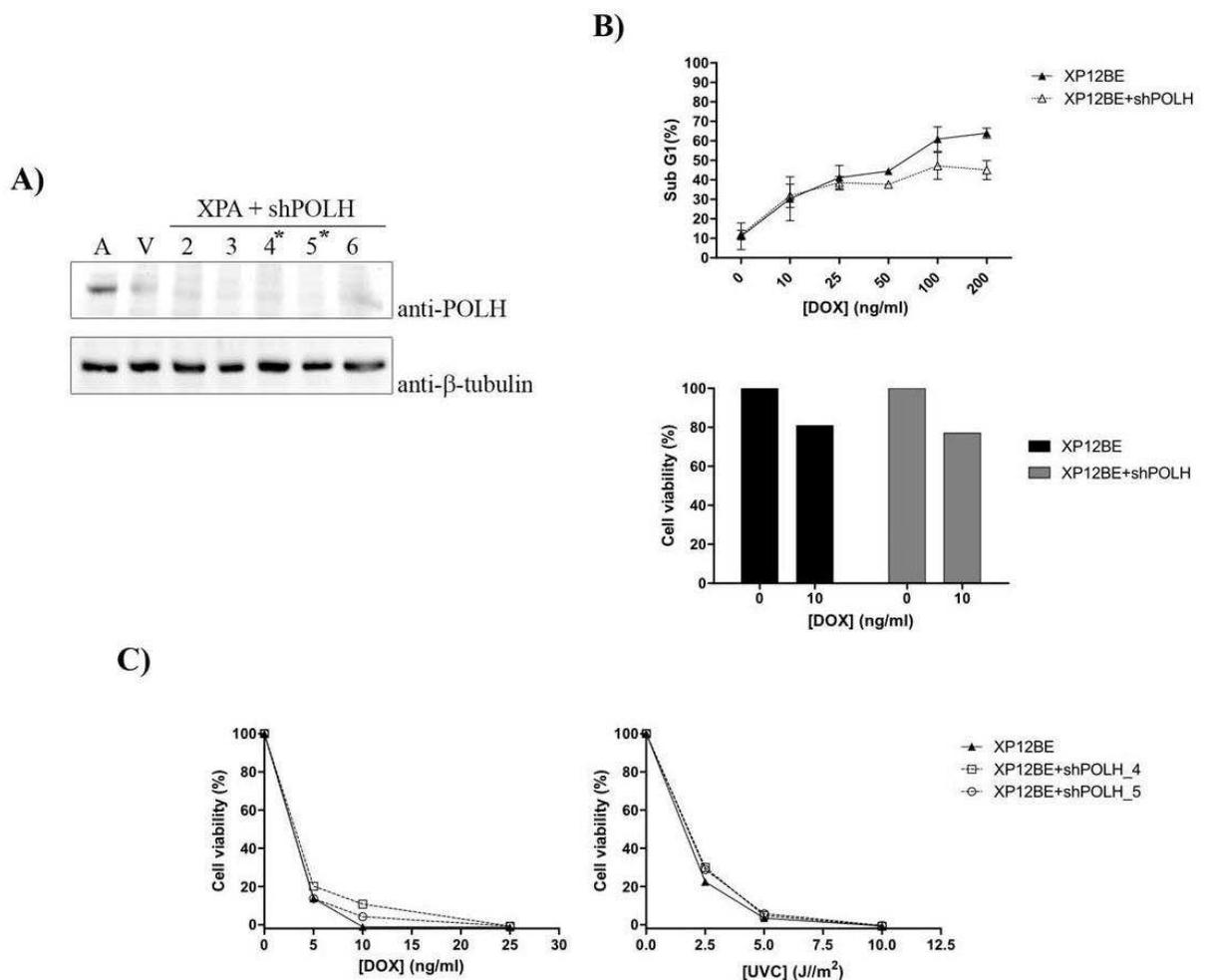


Figure 69. La réduction du niveau d'expression de Pol η dans les cellules XP-A ne modifie pas la sensibilité des cellules à la DOX. A) Western blot montrant l'expression de Pol η (POLH) dans les cellules XP-A (A - XP12BE), XP-V (V - XP30RO), ainsi que dans les cellules XP-A infectées par des shRNA (XPA + shPOLH). Les chiffres indiquent les différentes séquences de shRNA pour POLH de la bibliothèque de vecteurs lentivirus de SIGMA-ALDRICH. Dans les expériences montrées en (B) et (C), les cellules XP12BE avec la séquence n°4 (B), ou les séquences n°4 et n°5 (C), ont été utilisées. B) Les cellules ont été traitées pendant 48 heures, et la mort cellulaire (apoptose) a été analysée par cytométrie de flux (Sub-G1), ou la viabilité cellulaire a été analysée par des tests XTT. C) Les cellules ont été traitées pendant 72 heures, et la viabilité cellulaire a été analysée par des tests XTT.

6. Implication de Pol η et de XPC en réponse au traitement à la DOX : résultats préliminaires avec les cellules XP-C et XP-C/Pol η ^{KD}

Afin de déterminer si la double déficience à la fois en Pol η et en NER modifie la sensibilité des cellules au traitement à la DOX en comparaison aux cellules simples déficientes, nous avons décidé d'évaluer la sensibilité des cellules XP-C/Pol η ^{KD} par rapport aux cellules isogéniques XP-C. L'utilisation de ce modèle d'étude présente plusieurs avantages. D'une part, il a déjà été montré que les cellules XP-C sont sensibles au traitement à la DOX (Carvalho et al. 2010) et, d'autre part, nous disposons de ce modèle isogénique XP-C/Pol η ^{KD} dans lequel l'extinction fonctionnelle de Pol η a été validée (Partie I des résultats).

Nous avons évalué ainsi la prolifération des cellules XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} 72 heures après traitement à différentes doses de DOX par le test XTT (Figure 70). Et, nous n'avons pas observé de différence dans la prolifération de ces deux lignées cellulaires en réponse à cette drogue. Ces données doivent être confirmées, mais elles sont en accord avec les résultats obtenus avec les cellules XP-A et XP-A shPOLH.

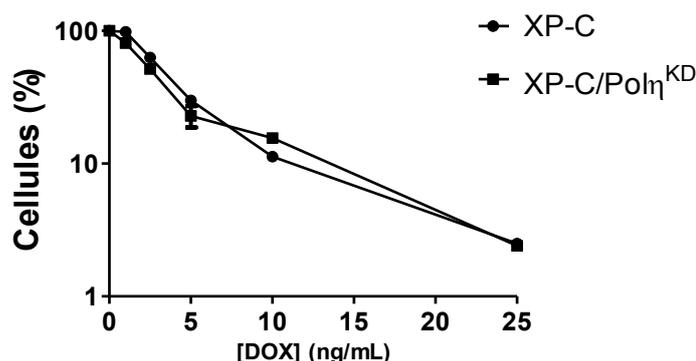


Figure 70. Prolifération des cellules XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} 72 heures après traitement à différentes doses de DOX. Les points représentent le pourcentage de prolifération évaluée par le test XTT par rapport au contrôle non traité. La prolifération après 5 ng/mL de DOX a été évaluée deux fois de façon indépendante et les erreurs standards sont représentées.

En conclusion, nous avons montré que les protéines XPA et Pol η sont impliquées dans la réponse à des dommages provoqués par la doxorubicine, autres que les CDB. De plus, en réponse à ces dommages, il semble que ces deux protéines agissent de concert en réponse à un traitement à la DOX. Une étude spécifique de l'éventuelle interaction entre la voie NER et Pol η devra permettre de mieux comprendre la prise en charge des lésions induites par un traitement à la DOX.

DISCUSSION

ET

PERSPECTIVES

Le principal objectif de mon travail de thèse était d'évaluer l'implication de l'ADN polymérase η (Pol η) dans la réponse aux dommages des cellules humaines XP-C exposées aux rayons UVC. J'ai ainsi étudié les réponses aux dommages de l'ADN des cellules sauvages, XP-V (déficientes en Pol η), XP-C et XP-C/Pol η ^{KD} exposées à une faible dose d'UVC.

La déficience en Pol η dans des cellules humaines ne conduit pas à une hypersensibilité aux rayons UV comme celle observée pour les cellules déficientes en NER (Cleaver 1989) (Figure 40). Néanmoins j'ai montré au cours de ce manuscrit, que lorsque la sous-voie GGR n'est pas fonctionnelle, le défaut en Pol η mène à une hypersensibilisation des cellules XP-C à une faible dose d'UVC. Ce résultat révèle un rôle crucial de Pol η dans ces cellules.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les différents résultats obtenus au cours de mon travail de thèse, les résultats observés seront discutés pour chaque lignée de façon indépendante. Et, la comparaison entre elles sera faite au fur et à mesure.

I. Réponse aux dommages des cellules XP-V irradiées aux UV: réplication des CPDs par Pol η à la fourche de réplication

L'analyse de la réplication de l'ADN par cytométrie de flux a montré que les cellules XP-V sont arrêtées en phase S du cycle cellulaire 24 heures après exposition à une faible dose d'UVC. A ce temps, les cellules sauvages présentent un cycle cellulaire normal, comparable à celui observé en absence de traitement. Suite à l'exposition à une dose plus forte d'UVC, les cellules XP-V sont clairement arrêtées en début de la phase S (Figures 42 et 43). Ces résultats vont dans le sens de l'action de Pol η sur la réplication des CPDs directement à la fourche de réplication et lorsque Pol η est absente, les CPDs bloquent les fourches, en accord avec des travaux précédents (Jansen et al. 2009b; Despras et al. 2010; Temviriyankul et al. 2012).

De plus, l'exposition aux UVC a induit la formation de γ H2AX, la forme phosphorylée de l'histone H2AX, dans les cellules XP-V. Celle-ci a été détectée à partir de 2 heures, comme pour les cellules sauvages, mais le marquage de γ H2AX est resté constant, autour de 30% de cellules marquées, jusqu'à au moins 24 heures après le traitement (Figure 44). A ce temps, les cellules sauvages ne présentaient plus de γ H2AX et les cellules XP-V marquées pour γ H2AX étaient principalement en phase S du cycle cellulaire (Figure 46). Le marquage maximum de γ H2AX a coïncidé avec la détection

de cassures simples-brin de l'ADN (CSB) par le test des comètes dans les mêmes conditions (Figure 53). De plus, la formation de γ H2AX a été détectée aux sites auxquels la protéine RPA a été recrutée (Figure 54).

Ces résultats suggèrent que la formation de γ H2AX induite par les rayons UVC correspond à la présence d'ADN simple-brin (ADNsb), comme il a déjà été proposé (Ward & Chen 2001; Marti et al. 2006; Matsumoto et al. 2007). Et, l'ensemble de ces données indique que Pol η agit à la fourche de réplication et que, lorsqu'elle est absente, il y a formation de régions d'ADNsb pendant la réplication. Celles-ci peuvent être générées par le découplage entre l'hélicase et la polymérase répllicative bloquée par une lésion à la fourche de réplication (Chang et al. 2006).

La formation de régions d'ADNsb recouvertes par la protéine RPA est le point de départ de l'activation de la voie ATR, comme je l'ai décrit dans l'introduction. Et, cette voie peut être inhibée par la caféine (Heffernan et al. 2009; de Feraudy et al. 2010; Despras et al. 2010; Elvers et al. 2011). J'ai retrouvé le résultat connu de l'hypermobilisation des cellules XP-V irradiées aux UV par la caféine, alors que celle-ci n'a aucun effet sur les cellules sauvages (Figures 56 et 57) (Cleaver 1989). De plus, en réponse à ce traitement, la progression des fourches de réplication était perturbée (Figure 56) et des cassures double-brin de l'ADN (CDB) ont été générées dans les cellules XP-V irradiées (Figure 67). Ces observations montrent, de façon indirecte, que la voie ATR est hyperactivée par les régions d'ADNsb formées en absence de Pol η . Et, l'hyperactivation de cette voie est responsable de la stabilisation des fourches bloquées et, par conséquent, de la prévention de formation de cassures double-brins de l'ADN (Cimprich & Cortez 2008; Despras et al. 2010). De plus, la phosphorylation de la protéine Chk1 par la kinase ATR aux sites de fourches de réplication bloquées conduit à l'activation du point de surveillance intra-S selon lequel l'élongation de la réplication initiée ainsi que le démarrage de la réplication à partir d'autres origines de réplication sont inhibés (Cimprich & Cortez 2008; Kaufmann 2010).

II. Réponse aux dommages des cellules XP-C irradiées aux UV : TLS post-répllicative

1. TLS post-répllicative dans les cellules XP-C irradiées aux UV

En réponse à une faible dose d'UVC, les cellules XP-C n'ont pas été bloquées en phase S, mais se sont accumulées en phase G2 24 heures après l'irradiation (Figures 22 et 23). Et, suite à une irradiation à une dose plus forte d'UVC, elles se sont clairement accumulées en fin de phase S et en phase G2 (Figure 22). De plus, les cellules XP-C marquées pour γ H2AX ont été détectées en phases S et G2 du cycle cellulaire (Figures 29 et 30). Et, le marquage de γ H2AX a coïncidé avec celui de RPA aux sites du noyau irradiés localement et dans les cellules XP-C, je n'ai pas détecté des CSB après irradiation.

D'après ces résultats, la formation de γ H2AX peut être associée à la génération d'ADNsb comme pour les cellules XP-V. Cependant, ces régions d'ADNsb ont été détectées en phase S comme pour les cellules XP-V mais également en phase G2. De plus, contrairement aux cellules XP-V, il n'y pas eu formation de CSB après irradiation dans les cellules XP-C (Figures 48 et 53). Ces résultats indiquent que les régions d'ADNsb générées dans les cellules XP-C ne sont pas liées au blocage des fourches de réplication, ce qui est accord avec le fait que les cellules XP-C n'ont pas été bloquées pendant la réplication.

Par ailleurs, les cellules XP-C ont été arrêtées en phase G2 du cycle cellulaire. Or, il a été montré que des régions d'ADNsb formées en phases S et G2 du cycle cellulaire déclenchent l'activation de points de surveillance et conduit à l'arrêt des cellules en phase G2 (Jansen et al. 2009a; Jansen et al. 2009b; Callegari et al. 2010; Diamant et al. 2012; Temviriyankul et al. 2012). De plus, la formation de ces régions d'ADNsb observée en phases S et G2 est en accord avec le modèle de réparation post-répllicative (en anglais, post-replicative repair) également nommé comblement de brèches post-répllicative (en anglais, post-replicative gap filling). En effet, selon ce modèle, lorsque les ADN polymérase répliquatives sont bloquées par des lésions, la réplication redémarre en aval des dommages par repriming. Par conséquent, des brèches d'ADNsb (en anglais, gaps) sont formées au cours de la phase S et se retrouvent en phase G2 lorsque tout le génome est répliqué (Lehmann & Fuchs 2006; Jansen et al. 2009a; Diamant et al. 2012). Ces brèches peuvent être comblées par l'action d'ADN polymérase de translésion mais aussi par des processus dépendants d'homologie. Au

cours de ce travail, nous nous sommes intéressés uniquement à la synthèse translésionnelle, et j'appellerai dorénavant ce mécanisme « TLS post-réplivative », en opposition à la « TLS à la fourche de réplification », proposée pour la réplification des CPDs par Pol η dans la section précédente.

En conclusion, en recoupant ces données, la formation de régions d'ADNsb dans les cellules XP-C peut être liée à la génération de brèches d'ADNsb au cours de la réplification du génome, qui s'accumulent en phase G2, activent des points de surveillance ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2, selon le modèle de TLS post-réplivative (Jansen et al. 2009a).

Si cette interprétation des résultats est correcte, la génération de régions d'ADNsb dans les cellules XP-C doit activer les points de surveillance via activation de la voie ATR, comme dans les cellules XP-V. En effet, il a été montré que l'activation de points de surveillance par les régions d'ADNsb au niveau des brèches formées au cours de la réplification dépend de la phosphorylation de la protéine Chk1 par la kinase ATR (Jansen et al. 2009a; Jansen et al. 2009b; Temviriyankul et al. 2012). D'après les résultats présentés dans ce manuscrit, l'inhibition de cette kinase par la caféine a induit une augmentation de la sensibilité des cellules XP-C irradiées (Figures 56 et 57) et elle a également conduit à la perturbation de la progression des fourches de réplification ainsi qu'à la génération de CDB, comme pour les cellules XP-V (Figures 56 et 67). Par conséquent, l'ensemble de ces résultats indique que la voie ATR est impliquée dans l'activation du point de surveillance par l'ADNsb généré au niveau des brèches et dans la prévention de la formation de CDB à partir de ces brèches d'ADNsb. En effet, un travail récent a proposé que des brèches d'ADNsb peuvent conduire à la formation de CDB lorsqu'elles ne sont pas comblées (Elvers et al. 2011).

2. TLS post-réplivative des 6-4PPs

L'ensemble des observations des cellules XP-V et XP-C irradiées indique que les résultats obtenus pour la lignée déficiente en GGR sont dus aux lésions de type 6-4PPs parce que (i) les cellules XP-C ont présenté un arrêt en phase G2 plutôt qu'un blocage en phase S comme les cellules XP-V ; (ii) la formation de régions d'ADNsb est liée à la génération de brèches d'ADNsb dans les cellules XP-C et non pas au blocage des fourches de réplification comme les cellules XP-V et (iii) La réplification des CPDs est prise en charge par Pol η dans les cellules XP-C. Et, si les CPDs « en excès » ne

pouvaient pas être totalement pris en charge par Pol η , les cellules XP-C seraient bloquées au cours de la phase S, comme les cellules XP-V irradiées.

En conclusion, l'ensemble de ces observations supportent un modèle selon lequel les lésions de type 6-4PP présentes dans le génome des cellules humaines sont tolérées par un mécanisme de TLS post-répllicative. Ce modèle a également été proposé dans des fibroblastes embryonnaires de souris (Jansen et al. 2009b).

Bien que les résultats observés pour les cellules XP-C semblent bien dus à la persistance des 6-4PPs et non pas à celle des CPDs, il serait judicieux de confirmer cela en éliminant de façon spécifique les 6-4PPs. Il existe des enzymes capables de reverser directement les dimères de pyrimidine en monomères, les photolyases. Ces protéines, absentes chez les mammifères placentaires, sont spécifiques des 6-4PPs ou des CPDs. Elles réparent l'un ou l'autre type de lésion lorsqu'elles sont photo-réactivées, c'est-à-dire exposées à la lumière bleue/violette et aux rayons UVA proches (Menck 2002). Il serait donc possible d'employer des adénovirus recombinants portant le gène codant la photolyase CPD ou la photolyase 6-4PP afin de n'étudier que les effets d'un seul type de lésion provoquée par les rayons UVC dans les cellules humaines (de Lima-Bessa et al. 2008).

Par ailleurs, bien qu'il ait été proposé que les cellules XP-C ne soient pas capables d'activer le point de surveillance en phase G1 du cycle cellulaire (Novarina et al. 2011; Sertic et al. 2012), ce résultat est encore controversé (Vrouwe et al. 2011). Les lignées que j'ai utilisées sont transformées par l'antigène T du virus simien 40 (SV40) qui séquestre la protéine p53 et par conséquent abolit le point de surveillance en phase G1. Afin de confirmer que l'arrêt en phase G2 observé dans les cellules XP-C irradiées est bien lié à la TLS post-répllicative et non pas à l'impossibilité de ces cellules à s'arrêter en phase G1, il est important de vérifier ce résultat dans des cellules XP-C primaires.

3. TLS post-répllicative des CPDs dans les cellules XP-V

De façon similaire aux cellules XP-C 24 heures après irradiation, les cellules XP-V ont présenté une légère accumulation de cellules en phase G2 mais plutôt à 72 heures après l'irradiation (Figures 42 et 43). Ce résultat peut refléter un mécanisme de sauvegarde (en anglais backup) par TLS post-répllicative. En effet, plusieurs auteurs ont proposé que les ADN polymérases Pol η , Pol κ et Pol ζ prennent en charge la réplification des CPDs en absence de Pol η et qu'elles seraient responsables de la mutagenèse induite

dans les cellules XP-V (Ziv et al. 2009; Livneh et al. 2010; Temviriyankul et al. 2012). De plus, étant donné que ce mécanisme de sauvegarde n'interviendrait qu'après un arrêt prolongé des fourches de réplication (détecté par l'accumulation des cellules XP-V en phase S 24 heures après irradiation), ce mécanisme serait tardif par rapport au blocage des fourches de réplication par la lésion, en accord avec Temviriyankul et coll. (Temviriyankul et al. 2012).

III. Implication de Pol η dans la réponse aux dommages des cellules XP-C irradiées à faible dose d'UVC

1. Est-ce que Pol η est impliquée dans la TLS des 6-4PPs ?

Lorsque l'expression de Pol η a été réduite de façon significative et stable dans les cellules XP-C, 24 heures après irradiation, les cellules se sont accumulées en phases S et G2 du cycle cellulaire (Figures 42 et 43). A ce temps, le marquage de γ H2AX dans près de 60% des cellules XP-C/Pol η^{KD} (Figure 44) a été détecté au cours des phases S et G2 (Figure 46). De plus, des cassures de l'ADN et, en particulier des CSB, ont été générées 24 heures après irradiation (Figure 52). J'ai également détecté des cellules avec un signal plus intense de γ H2AX ainsi que des CDB mais ces résultats seront discutés par la suite.

En réponse à une exposition aux UV, les cellules XP-C/Pol η^{KD} se sont accumulées en phase G2 comme les cellules parentales XP-C, mais ont aussi été bloquées en phase S comme les cellules XP-V. De plus, des régions d'ADNsb ont été formées à la fois en conséquence de l'arrêt des fourches de réplication comme les cellules XP-V (d'après la détection de CSB par le test des comètes) et de brèches d'ADNsb, indiquées par le marquage de γ H2AX en phase G2, comme celui observé pour les cellules XP-C. En résumé, les cellules XP-C/Pol η^{KD} ont présenté le même phénotype que celui des cellules isogéniques XP-C mais en plus le phénotype associé à l'absence de Pol η observé dans les cellules XP-V.

L'explication la plus simple pour les résultats obtenus dans les cellules XP-C/Pol η^{KD} irradiées est en effet la superposition des phénotypes XP-C et XP-V. Dans les cellules XP-V, la totalité des 6-4PPs et près de 50% des lésions CPDs sont réparées 24 heures après l'exposition aux UV (Costa et al. 2003). Lorsque la sous-voie de réparation GGR est déficiente, 70-85% des CPDs et des 6-4PPs persistent dans le génome (de Boer & Hoeijmakers 2000). Étant donné qu'en absence de Pol η , les CPDs bloquent la progression des polymérase répliquatives dans les cellules XP-V (résultats discutés

précédemment), l'accumulation de cellules XP-C/Pol η ^{KD} en phase S du cycle cellulaire peut être simplement due à la même raison. De plus, comme dans ces cellules doubles-déficientes, les 6-4PPs persistent exactement comme dans la lignée isogénique XP-C, l'accumulation de ces cellules en phase G2 peut être également liée à l'activation du point de surveillance par les régions d'ADNsb au niveau des brèches formées au cours de la réplication.

Par ailleurs, il est actuellement établi que les lésions 6-4PPs sont répliquées par l'action de concert de deux polymérases translésionnelles, une Pol d'insertion et une Pol d'extension (Bresson & Fuchs 2002; Yoon et al. 2010; Temviriyankul et al. 2012). Et, il a été montré que Pol η agit en tant que Pol d'insertion dans la TLS des 6-4PPs (Johnson et al. 2001; Bresson & Fuchs 2002; Yoon et al. 2010), même si ce résultat est encore controversé (Ziv et al. 2009; Temviriyankul et al. 2012). Par conséquent, à partir des résultats obtenus avec les cellules XP-C/Pol η ^{KD} exposées à une faible dose d'UVC, nous pouvons discuter de l'éventuel rôle de Pol η dans la TLS des 6-4PPs. Bien que l'ensemble des observations présentées dans ce manuscrit ne me permette pas de conclure sur l'implication de cette Pol dans la prise en charge spécifique des 6-4PPs, à partir de données publiées par d'autres auteurs, il est possible d'envisager une hypothèse sur la contribution de Pol η dans la TLS post-répliquative des 6-4PPs.

Jansen et coll. ont proposé un modèle dans lequel les 6-4PPs seraient tolérés par TLS post-répliquative où Pol η serait la principale Pol d'insertion. Plus précisément, ils proposent que Pol η soit recrutée au niveau des 6-4PPs bloquant la fourche de réplication. Pol η insérerait le premier nucléotide face au 6-4PP mais, incapable d'allonger cette amorce, conduirait à un nouveau blocage de la fourche de réplication. Ceci serait rapidement résolu par le redémarrage de la réplication en aval par repriming (Jansen et al. 2007). Si cette hypothèse est correcte, alors l'absence de Pol η dans les cellules déficientes en réparation des 6-4PPs devrait conduire au blocage prolongé des fourches de réplication. Cette interprétation permettrait d'expliquer mon observation de l'accumulation de cellules XP-C/Pol η ^{KD} en phase S du cycle cellulaire 24 heures après irradiation.

Par ailleurs, un travail récent a montré que lorsque l'expression de Pol η est réduite, les fibroblastes embryonnaires de souris accumulent des 6-4PPs non répliqués, ce qui indique que Pol η est en effet impliquée dans la réplication des 6-4PPs (Temviriyankul et al. 2012), bien que les auteurs concluent que le rôle de cette Pol soit restreint à la TLS des CPDs. Par contre, cet effet a été beaucoup plus prononcé dans les

cellules dont l'expression de REV1 a été réduite où en fait tous les 6-4PPs n'ont pas été répliqués. Or, il est de plus en plus établi que REV1 joue le rôle de plateforme pour les Pol de translésion et qu'elle soit ainsi impliquée dans le changement entre Pol d'insertion et Pol d'extension (Tissier et al. 2004; Friedberg et al. 2005; Sale et al. 2012). Donc les données publiées par ces auteurs suggèrent que, bien que Pol η soit impliquée dans la TLS des 6-4PPs, il y aurait une Pol d'insertion qui pourrait également prendre en charge ce type de lésion. En effet, différents auteurs ont montré que d'autres polymérase pourraient également intervenir dans la TLS des 6-4PP en tant que Pol d'insertion en plus de Pol η (Bresson & Fuchs 2002), comme Pol ι (Yoon et al. 2010). Et, en absence de Pol η , 40% de la TLS des 6-4PPs serait encore présente (Bresson & Fuchs 2002). D'après ce modèle selon lequel une partie des 6-4PPs est prise en charge par Pol η et l'autre par Pol ι (ou une autre Pol d'insertion), nous pouvons émettre une hypothèse afin d'expliquer les résultats que j'ai obtenus pour les cellules XP-C/Pol η ^{KD}. En effet, une partie des 6-4PPs pourrait conduire au blocage prolongé des fourches de réplication à cause du défaut de Pol η comme nous l'avons discuté juste avant. L'autre partie des 6-4PPs serait prise en charge par Pol ι ou autre Pol en tant que Pol d'insertion et par Pol ζ (et éventuellement aussi Pol κ) (Jansen et al. 2007) en tant que Pol d'extension selon le modèle de TLS post-réplivative. Ceci permettrait d'expliquer l'arrêt des cellules XP-C/Pol η ^{KD} aussi en phase G2 24 heures après irradiation.

Enfin, Jansen et coll. ont montré que dans les fibroblastes embryonnaires de souris déficients en XPC dans lesquels l'expression de REV1 a été réduite, la progression des cellules en phase S est ralentie 24 heures après 2 J/m² et les cellules sont arrêtées en phase G2 de façon irréversible. Ils en concluent que le génome est complètement répliqué malgré le blocage de fourches de réplication (Jansen et al. 2009b). Étant donné que REV1 n'est pas impliquée dans la TLS des CPDs par Pol η , le blocage des fourches dans ce cas est forcément provoqué par les 6-4PP. Par conséquent, lorsque REV1 est absente, les 6-4PPs ne peuvent pas être tolérés par TLS et l'excès de 6-4PPs non répliqués au cours de la phase S induit un arrêt irréversible en phase G2 (Jansen et al. 2009b). Or, dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD} irradiées à 2 J/m², j'ai observé les mêmes effets sur le cycle cellulaire que Jansen et coll., ont observé dans les fibroblastes embryonnaires de souris Xpc^{-/-}, Rev1^{-/-} exposés aux UV, c'est-à-dire, un blocage en phases S et G2 24 heures après irradiation ainsi qu'un arrêt plus prononcé à 72 heures que celui observé à 24 heures, indiquant un arrêt irréversible en phase G2. D'après cette comparaison, la TLS des 6-4PPs dépendrait uniquement de Pol η comme

elle dépend effectivement de REV1 (Jansen et al. 2009b; Temviriyankul et al. 2012). En effet il a été montré que la localisation de Pol ι dépend de celle de Pol η (Kannouche et al. 2003). Bien que la coordination de la localisation de ces deux polymérase soit encore controversée (Gueranger et al. 2008), en absence de Pol η , aucune des deux Pol d'insertion ne serait capable de démarrer la TLS des 6-4PPs. Cette idée est renforcée dans notre contexte d'étude par l'hypersensibilité des cellules XP-C/Pol η ^{KD} en réponse à une faible dose d'UVC.

En outre, dans tous les cas, c'est-à-dire si la TLS des 6-4PPs dépend uniquement de Pol η ou si Pol ι peut également prendre en charge ce type de lésion, l'accumulation de cellules XP-C/Pol η ^{KD} en phase G2 plus prononcée 72 heures après l'irradiation qu'à 24 heures peut refléter un mécanisme de sauvegarde de TLS post-réplivative tardif par rapport au blocage de la fourche. Néanmoins étant donné que dans ces cellules, l'exposition à une faible dose d'UVC a induit de l'apoptose, cela suggère que la prise en charge des 6-4PPs par ce mécanisme de sauvegarde ne pourrait être que partiel.

En conclusion, à partir de l'ensemble des résultats obtenus au cours de mon travail de thèse, j'envisage quelques hypothèses. Tout d'abord, je propose que les CPDs sont répliqués directement à la fourche de réplication par Pol η . Lorsque celle-ci est absente, un mécanisme de sauvegarde constitué de deux Pol prendrait en charge la réplication de ces lésions par TLS post-réplivative et ce, de façon tardive par rapport au blocage des fourches. D'autre part, j'envisage que les 6-4PPs sont tolérés rapidement après le blocage des fourches par TLS post-réplivative. Dans ce cas, Pol η serait la principale Pol d'insertion et en son absence, un mécanisme tardif par rapport au blocage des fourches interviendrait selon le modèle de TLS post-réplivative. Enfin, ceci ne pourrait être que partiel car l'absence de Pol η dans les cellules XP-C irradiées est essentiellement délétère, comme nous discuterons par la suite. L'ensemble de ces hypothèses sont représentées dans le schéma proposé dans les Figures 71 et 72.

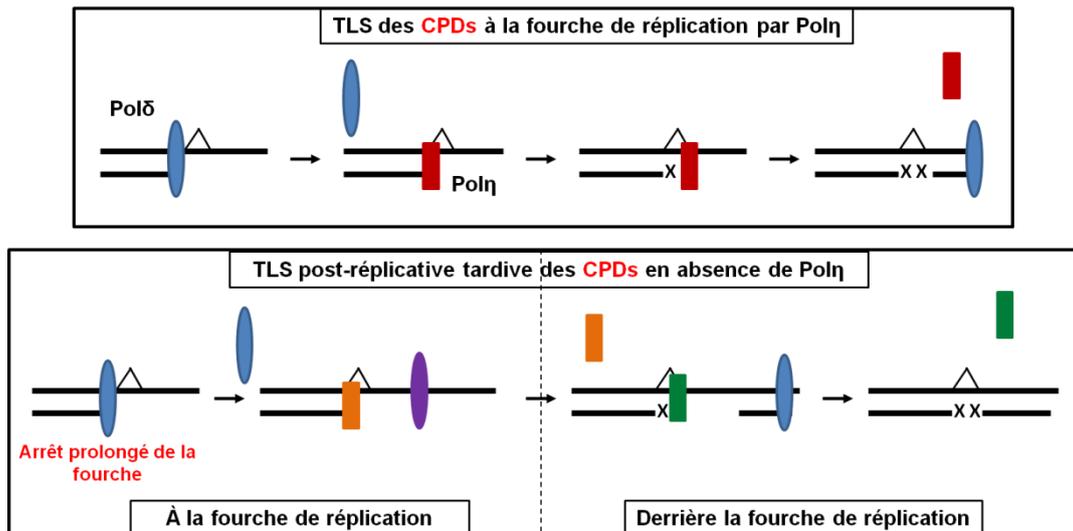


Figure 71. Modèle proposé pour la TLS des CPDs en présence ou en absence de Polη. Lorsque la polymérase réplivative (en bleu) est bloquée par un CPD, Polη (en rouge) est recrutée et réplique ainsi le CPD directement à la fourche, permettant ensuite la reprise de la réplivative par la polymérase réplivative. En absence de Polη, la fourche reste bloquée dans un premier temps, puis une Pol d'insertion est recrutée au niveau du CPD et la réplivative redémarre en aval par repriming (probablement par Polα, en violet), laissant des brèches d'ADNsb en amont. Après insertion du premier nucléotide, la Pol d'insertion est remplacée par une Pol d'extension (très probablement Polζ, en vert) qui comble la brèche, selon le modèle de TLS post-réplivative.

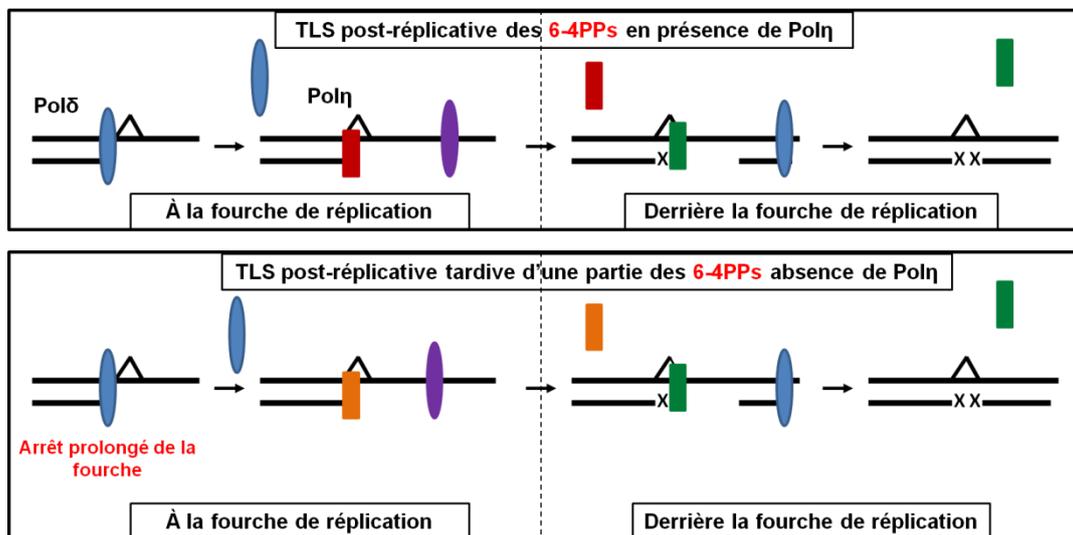


Figure 72. Modèle proposé pour la TLS des 6-4PPs en présence ou en absence de Polη. Lorsque la polymérase réplivative (en bleu) est bloquée par un 6-4PP, Polη (en rouge) est recrutée et la réplivative redémarre en aval par repriming (probablement par Polα, en violet), laissant des brèches d'ADNsb en amont. Après insertion du premier nucléotide, la Pol d'insertion est remplacée par une Pol d'extension (très probablement Polζ, en vert) qui comble la brèche. En absence de Polη, les fourches restent bloquées dans un premier temps, puis un mécanisme de sauvegarde tardif constitué de deux Pol prend en charge une partie des 6-4PP bloquant les fourches aussi par TLS post-réplivative.

Afin de vérifier ces hypothèses, tout d'abord, je devrai confirmer que les résultats obtenus avec les cellules XP-C/Pol η ^{KD} sont bien dus à la réduction de l'expression de Pol η dans les cellules XP-C, en complétant ces cellules avec un ADN complémentaire codant Pol η . Par ailleurs, il est indispensable d'évaluer individuellement les effets des 6-4PPs et des CPDs dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD}. Là encore, la stratégie des photolyases peut être utilisée pour réparer spécifiquement l'un ou l'autre type de lésion. Et, dans ce cas, j'aurai un modèle très intéressant pour étudier directement l'implication de Pol η dans la TLS des 6-4PPs présentes dans le génome de cellules humaines. De plus, la progression des fourches de réplication en présence de CPDs ou des 6-4PPs peut être évaluée de façon directe et précise sur des molécules d'ADN individuelles par la technique de peignage moléculaire (en anglais DNA fiber assay ou DNA combing).

2. Pol η est cruciale dans la survie des cellules XP-C exposées à faible dose d'UVC

L'ensemble de mes résultats montrent clairement que l'absence de Pol η dans les cellules humaines XP-C les rend hypersensibles aux rayons UVC, même après exposition à une faible dose.

Bien que dans les cellules XP-C, la plupart des CPDs persistent au long des cycles cellulaires, des mécanismes de sauvegarde de réplication de ces lésions en absence de Pol η devraient a priori permettre la survie des cellules XP-C/Pol η ^{KD}. Cependant, la réduction de l'expression de Pol η dans les cellules XP-C irradiées à une faible dose d'UVC a conduit à une forte perturbation de la progression des fourches de réplication (Figure 42), à la génération de quantités importantes de CDB (Figure 53) ainsi qu'à l'induction de l'apoptose (Figure 43). Il est intéressant de noter que ces résultats sont comparables à ceux observés dans les cellules XP-C et XP-V irradiées traitées en plus avec la caféine. Et, lorsque les cellules XP-C/Pol η ^{KD} irradiées ont été traitées avec la caféine, tous ces effets ont été fortement amplifiés (Figures 56, 57 et 68). De plus, il a été proposé que l'arrêt prolongé des fourches de réplication par des lésions provoquées par irradiation UV peut générer des CDB (Limoli et al. 2000; Limoli et al. 2002; Ward et al. 2004; Garinis et al. 2005). Je propose donc que dans les cellules XP-C/Pol η ^{KD}, la persistance des CPDs et/ou des 6-4PPs aux fourches de réplication conduit à la formation de CDB. Par ailleurs, dans notre étude, la détection de CDB a coïncidé à chaque fois avec l'induction de l'apoptose, ce qui indique qu'au moins une partie de ces

CDB n'ont pas été réparées et ont conduit à la mort cellulaire. Cette hypothèse est en accord avec des travaux précédents qui ont proposé que l'arrêt prolongé des fourches de réplication par des CPDs ou de 6-4PPs est cytotoxique (Temviriyankul et al. 2012) et que l'apoptose induite par l'irradiation aux UVC est due à la formation de CDB dépendante de la réplication de lésions non réparées (Dunkern & Kaina 2002; Garinis et al. 2005).

Bien qu'il ait déjà été proposé que la formation de CDB induite par l'irradiation UV peut conduire à l'induction de l'apoptose (Dunkern & Kaina 2002; Garinis et al. 2005; Batista et al. 2009), je ne peux pas déterminer si les CDB détectées par le test des comètes neutre dans mon travail ne correspondent pas déjà à la fragmentation de l'ADN des cellules en début de voie apoptotique. Afin de répondre à cela, je pourrai utiliser des inhibiteurs de caspases, comme Z-VAD-FMK par exemple (Carvalho et al. 2010), afin d'inhiber la voie de l'apoptose et en particulier la DNase CAD (de l'anglais, caspase-activated DNase), et évaluer si l'irradiation UV conduit à la formation de CDB par le test des comètes neutre.

IV. La formation de γ H2AX induite par l'irradiation UV

1. Formation de γ H2AX en phase G1 du cycle cellulaire

Jusqu'à présent, j'ai décrit la formation de γ H2AX observée dans les cellules en phases S et G2 du cycle cellulaire. Néanmoins, dans les cellules déficientes en XPC (cellules XP-C et XP-C/Pol η ^{KD}), γ H2AX a également été détectée en phase G1 dès 2 heures après l'irradiation mais de façon plus importante à partir de 7 heures (Figures 29, 30 et 46). La formation de régions d'ADN simple-brin dans les cellules XP-C irradiées en phase G1 peut être expliquée par le clivage aux sites des lésions par des nucléases, telle que l'incision des 6-4PPs par l'endonucléase Ape1 démontrée récemment (Vrouwe et al. 2011). Cela peut aussi correspondre à des brèches d'ADNs b générées au moment de l'excision du fragment d'ADN contenant la lésion par la sous-voie TCR. Par ailleurs, dans les lignées proficientes en XPC (cellules XP-C⁺, MRC5 et XP-V), la forme phosphorylée de H2AX a été détectée jusqu'à 7 heures dans les cellules en phase G1 (Figures 29, 30 et 46). Ce résultat est en accord avec la génération de brèches d'ADNs b par l'action de la sous-voie GGR (Marti et al. 2006; Hanasoge & Ljungman 2007; Matsumoto et al. 2007). De plus les cellules sauvages marquées pour γ H2AX étaient majoritairement en phase S (Figure 29). Ceci pourrait refléter la génération de régions d'ADNs b par un arrêt temporaire des fourches de réplication par les CPDs, avant leur

réplication par Pol η . En effet, les cellules sauvages ont présenté une légère accumulation en phase S 7 heures après l'irradiation (Figures 21 et 23).

2. Formation de γ H2AX et la voie ATR

Nous avons montré, de façon indirecte, que l'exposition aux UVC induit une hyperactivation de la voie ATR uniquement dans les cellules déficientes XP-V, XP-C et XP-C/Pol η ^{KD}. Et, il a été montré que l'histone H2AX, en réponse aux rayons UVC, est phosphorylée par la kinase ATR (Ward & Chen 2001; Matsumoto et al. 2007). Par conséquent, l'observation de marquage γ H2AX dans les cellules irradiées et traitées à la caféine, connue pour inhiber ATR, a été surprenante (Figure 59). Or, un travail récent a montré que la forme phosphorylée de H2AX est impliquée dans l'amplification de la signalisation liée à la formation de régions d'ADNsb (Wang et al. 2011). Il a été le premier à ma connaissance à proposer un rôle de γ H2AX dans la réponse aux dommages provoqués par les rayons UV. De façon schématique, le modèle proposé est comparable à celui que nous avons présenté en introduction dans le cas des CDB. L'hypothèse porte sur un rôle indirect de γ H2AX dans le recrutement de la protéine TOPBP1, impliquée dans l'activation de la voie ATR, via une interaction directe avec la protéine MDC1. Plus précisément, au niveau des fourches de réplication bloquées, l'histone H2AX serait phosphorylée initialement par la kinase ATR ou une autre kinase. Il est à noter que dans notre contexte où ATR est inhibée par la caféine, la formation initiale de γ H2AX doit nécessairement impliquer une autre kinase que celle-ci. Par conséquent, les régions d'ADNsb recouvertes par la protéine RPA aux fourches de réplication arrêtées seraient à côté de régions d'ADN double-brin recouvertes par γ H2AX (voir schéma de la Figure 73). Ceci conduirait au recrutement de MDC1 qui interagit directement avec γ H2AX et TOPBP1. Donc, le rôle de γ H2AX et MDC1 serait de recruter et augmenter la concentration locale de TOPBP1 et de faciliter ainsi l'hyperactivation de la voie ATR aux sites de fourches de réplication bloquées (Wang et al. 2011).

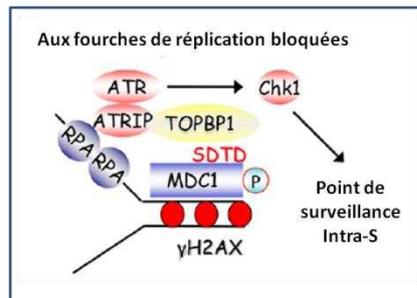


Figure 73. Modèle proposé par Wang et coll. pour le rôle de γ H2AX dans l'amplification du signal en réponse au blocage des fourches de réplication. (D'après Wang et coll., 2011)

En conclusion, je propose que les régions d'ADNsb générées au niveau à la fois des fourches de réplication bloquées et des brèches d'ADNsb induisent la phosphorylation de l'histone H2AX qui conduit à l'hyperactivation de la voie ATR. Celle-ci serait responsable de la stabilisation de ces régions d'ADN simple-brin (Cimprich & Cortez 2008; Despras et al. 2010) et par conséquent de la prévention de la formation de CDB.

3. Formation de niveaux élevés de γ H2AX ou « hauts niveaux de γ H2AX »

Par ailleurs, dans les cellules XP-C et XP-V irradiées, la caféine a induit l'apparition de cellules avec un signal plus intense de γ H2AX (Figures 61 à 63). Ce marquage plus fort de γ H2AX a été décrit précédemment par Cleaver et coll. et définit comme des niveaux élevés de γ H2AX (en anglais, high levels of γ H2AX) (de Feraudy et al. 2010). D'après les résultats présentés dans ce manuscrit, ce signal plus intense de γ H2AX a été observé majoritairement dans les cellules en phases S et G2 24 heures après irradiation UV. L'apparition de cellules présentant des niveaux élevés de γ H2AX a coïncidé avec la génération de CDB, détectées dans les mêmes conditions (Figure 67) et avec l'induction de l'apoptose 72 heures après le traitement (Figure 57). Il a été proposé que le traitement avec la caféine redirige les cellules en phase S irradiées aux UV dans une voie apoptotique passant par la voie ATM (Halicka et al. 2005; de Feraudy et al. 2010; Cleaver 2011). Or, il est connu que l'activation de la voie ATM conduit à la formation d'un signal plus fort et homogène de γ H2AX que celui observé après irradiation aux UV (Marti et al. 2006; Vrouwe et al. 2011). Et il est établi que la voie ATM est activée, en particulier, par la présence de CDB (Shiloh 2003). Je propose alors que lorsque l'hyperactivation de la voie ATR est inhibée, il n'y aurait plus de stabilisation des régions d'ADNsb qui deviendraient ainsi des CDB. Ces dernières

activeraient la voie ATM, ce qui conduirait à un marquage intense de γ H2AX, les niveaux élevés de γ H2AX. Les CDB induites par l'exposition aux rayons UV ne seraient pas réparées et conduiraient les cellules dans une voie apoptotique, selon ce que nous avons discuté avant. Il est intéressant de noter que ce même mécanisme permet d'expliquer l'ensemble des résultats obtenus dans les cellules XP-C/ $\text{Pol}\eta^{\text{KD}}$ irradiées même en absence de caféine. Dans ce cas, le point de départ de la déstabilisation des régions d'ADN simple-brin est le blocage prolongé des fourches de réplication, discuté précédemment.

Afin de valider mes interprétations des résultats, il serait très intéressant de vérifier directement si les niveaux élevés de γ H2AX correspondent effectivement aux CDBs. Les cellules peuvent être isolées selon leur niveau de marquage de γ H2AX par FACS (de l'anglais, fluorescence activated cell sorting) et être directement évaluées pour la formation de cassures simple- et double-brin par le test des comètes en conditions alcalines et neutres. Ceci permettrait de définir concrètement la relevance de la formation de γ H2AX induite par les rayons UV en termes de cassures de l'ADN.

Je propose un modèle qui réunit les principales hypothèses envisagées dans ce manuscrit (Figure 74). Différents points doivent être vérifiés et analysés de façon plus spécifique et directe, comme je l'ai précisé au cours de cette discussion.

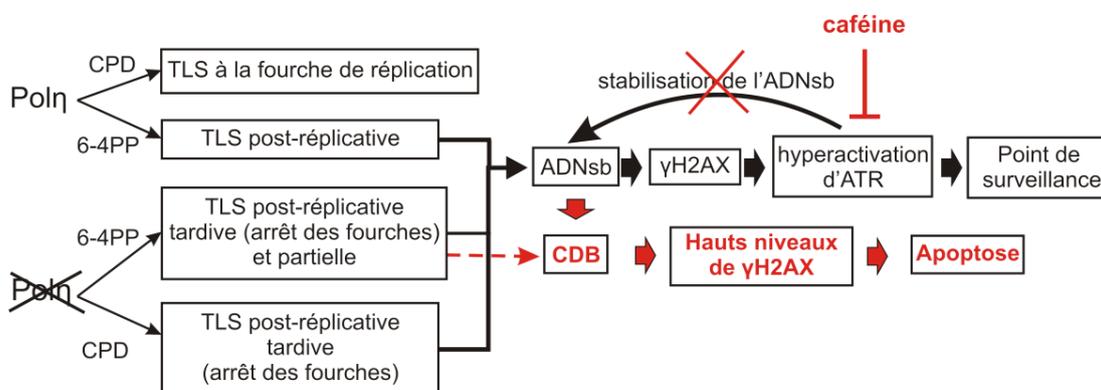


Figure 74. Modèle proposé pour la synthèse translesionnelle des CPDs et des 6-4PPs dans des cellules humaines proficientes ou déficientes en $\text{Pol}\eta$ ainsi que ses conséquences. La partie noire du schéma correspond aux conséquences de l'exposition aux rayons UV alors que la partie en rouge représente les effets de la caféine sur les cellules irradiées. La TLS des CPDs par $\text{Pol}\eta$ est rapide et efficace. $\text{Pol}\eta$ répliquerait les CPDs directement à la fourche de réplication. Lorsque $\text{Pol}\eta$ est absente, les CPDs sont répliqués par un mécanisme de sauvegarde tardif par rapport au blocage initial de la fourche selon le modèle de TLS post-réplivative. D'un autre côté, les 6-4PPs sont tolérés par TLS post-réplivative dans un mécanisme dépendant de deux polymérases. Puisque $\text{Pol}\eta$ est capable d'insérer le 1^{er} nucléotide lors de la TLS des 6-4PPs, je spécule que, lorsque cette polymérase est absente, un mécanisme de sauvegarde tardif prendrait en charge une partie des 6-4PPs bloquant les fourches. L'autre partie conduit à la formation de

cassures double brin (CDB), ce qui est indiqué par la flèche rouge en pointillés. Dans tous les cas, blocages de fourches de réplication ou formation de brèches, il y a des régions d'ADN simple-brin (ADNsb), ce qui conduit à la phosphorylation de l'histone H2AX sur la sérine 139. La formation de γ H2AX entraîne l'hyperactivation de la voie ATR, qui stabilise les régions d'ADNsb et induit un arrêt du cycle cellulaire. La caféine via son effet inhibitoire sur la voie ATR et, par conséquent, sur la stabilisation des régions d'ADNsb induit la formation de CDB dans les cellules irradiées. La réponse aux CDB implique la voie ATM qui phosphoryle H2AX et induit des niveaux élevés de γ H2AX (« hauts niveaux de γ H2AX »). Les CDB induites par les rayons UV conduisent principalement les cellules dans une voie apoptotique.

En conclusion, cette étude révèle que la TLS post-réplivative joue un rôle important dans la survie des cellules humaines XP-C exposées aux rayons UV. Plus précisément, elle suggère que les lésions de type 6-4PPs sont tolérées par TLS post-réplivative. Par ailleurs, j'ai démontré que Pol η joue un rôle critique lorsque les lésions provoquées par les UV ne sont pas éliminées par la sous-voie GGR. Des analyses avec les photolyases seront faites afin d'évaluer directement l'implication de Pol η dans la TLS des 6-4PPs présents dans le génome de cellules humaines.

J'ai donc établi la première lignée cellulaire humaine stable déficiente à la fois en Pol η et NER. Et, l'ensemble des résultats obtenus valide cette lignée comme modèle d'étude de mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN.

V. Implications de Pol η et de la voie NER en réponse à des drogues chimiothérapeutiques

Bien que l'implication de Pol η ainsi que celle de la voie NER soit établie dans la réponse aux dommages provoqués par les rayons UV, elles semblent également jouer un rôle dans les cellules traitées avec des drogues chimiothérapeutiques.

En particulier, dans le cas de la doxorubicine, les protéines XPA et Pol η sont nécessaires à la survie des cellules exposées à cet agent génotoxique (Partie II des résultats). De façon surprenante, la réduction de l'expression de Pol η dans les cellules XP-A n'a pas modifié la sensibilité de ces cellules à ce traitement. Bien que ces résultats ne soient pas encore conclusifs, ils ont été retrouvés lors d'expériences préliminaires dans les cellules XP-C et dans le modèle stable et isogénique XP-C/Pol η ^{KD}. Une explication possible pour ces observations est l'implication de Pol η dans l'étape de re-synthèse d'ADN de la voie NER, comme il l'a été suggéré pour Pol κ (Ogi et al. 2010). Néanmoins, à ma connaissance, aucune évidence du rôle de Pol η dans la voie NER n'a été publiée jusqu'à présent. Afin d'approfondir l'étude d'une éventuelle interaction

entre Pol η et la voie NER, les résultats obtenus avec les cellules double déficientes devront tout d'abord être confirmés. Et, si l'absence de Pol η dans les cellules XP-C n'a en effet aucune influence sur la réponse de ces dernières au traitement à la doxorubicine, il serait intéressant d'essayer de reproduire ce résultat à partir d'autres cellules XP.

De la même façon, il serait intéressant d'évaluer l'implication de Pol η et de XPC dans la réponse à d'autres drogues chimiothérapeutiques. Grâce au modèle des cellules XP-C/Pol η ^{KD}, il serait possible de mettre en évidence des éventuelles interactions entre ces protéines en réponse à des agents génotoxiques. Ceci permettrait de proposer de nouveaux rôles pour ces protéines. Dans cette optique, j'ai obtenu des résultats préliminaires avec ces cellules traitées au cisplatine. Cet agent est considéré « UV-like » car il provoque majoritairement des pontages intra-brins de l'ADN (Bowden et al. 2010). Néanmoins, il peut également induire d'autres types de lésions comme des pontages inter-brins de l'ADN (Enoiu et al. 2012). Par ailleurs, bien que l'implication de Pol η soit établie dans la réponse au cisplatine (Albertella et al. 2005; Chen et al. 2006), il n'est pas encore clair si les deux sous-voies GGR et TCR prennent en charge les lésions générées (Graf et al. 2011; Enoiu et al. 2012).

Actuellement, il est de plus en plus clair que les mécanismes impliqués dans les réponses cellulaires aux dommages de l'ADN peuvent se croiser et prendre ainsi en charge une large gamme de lésions. L'étude des effets de différents agents sur les modèles que je dispose devrait aider dans la mise en évidence de ces éventuelles interactions. La compréhension des mécanismes moléculaires qui interviennent dans les cellules exposées à des agents génotoxiques est particulièrement importante dans le cas des drogues chimiothérapeutiques. En effet, les protéines impliquées dans la réponse aux dommages peuvent être responsables de la résistance de cellules cancéreuses à un traitement. Ces protéines peuvent représenter par conséquent des cibles thérapeutiques potentielles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albertella M.R., Green C.M., Lehmann A.R. & O'Connor M.J. (2005). A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. *Cancer Res*, 65, 9799-806.
- Auclair Y., Rouget R. & Drobetsky E.A. (2009). ATR kinase as master regulator of nucleotide excision repair during S phase of the cell cycle. *Cell Cycle*, 8, 1865-71.
- Batista L.F., Chiganças V., Brumatti G., Amarante-Mendes G.P. & Menck C.F. (2006). Involvement of DNA replication in ultraviolet-induced apoptosis of mammalian cells. *Apoptosis*, 11, 1139-48.
- Batista L.F., Kaina B., Meneghini R. & Menck C.F. (2009). How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res*, 681, 197-208.
- Bétous R., Rey L., Wang G., Pillaire M.J., Puget N., Selves J., Biard D.S., Shin-ya K., Vasquez K.M., Cazaux C. & Hoffmann J.S. (2009). Role of TLS DNA polymerases eta and kappa in processing naturally occurring structured DNA in human cells. *Mol Carcinog*, 48, 369-78
- Biard D., Despras E., Sarasin A. & Angulo J. (2005). 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, 519-29.
- Biard D.S. (2007). Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res*, 35, 3535-50.
- Bensimon A., Aebersold R. & Shiloh Y. (2011). Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. *FEBS Lett*, 585, 1625-39.
- Bienko M., Green C.M., Crosetto N., Rudolf F., Zapart G., Coull B., Kannouche P., Wider G., Peter M., Lehmann A.R., Hofmann K. & Dikic I. (2005). Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science*, 310, 1821-1824.
- Bowden N.A., Ashton K.A., Avery-Kiejda K.A., Zhang X.D., Hersey P. & Scott R.J. (2010). Nucleotide excision repair gene expression after Cisplatin treatment in melanoma. *Cancer Res*, 70, 7918-26.
- BOYCE R.P. & HOWARD-FLANDERS P. (1964). RELEASE OF ULTRAVIOLET LIGHT-INDUCED THYMINE DIMERS FROM DNA IN E. COLI K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51, 293-300.
- Bresson A. & Fuchs R.P. (2002). Lesion bypass in yeast cells: Pol eta participates in a multi-DNA polymerase process. *EMBO J*, 21, 3881-7.
- Broughton B.C., Cordonnier A., Kleijer W.J., Jaspers N.G.J., Fawcett H., Raams A., Garritsen V.H., Stary A., Avril M.F., Boudsocq F., Masutani C., Hanaoka F., Fuchs R.P., Sarasin A. & Lehmann A.R. (2002). Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 815-820.
- Callegari A.J., Clark E., Pneuman A. & Kelly T.J. (2010). Postreplication gaps at UV lesions are signals for checkpoint activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8219-24.
- Camenisch U., Trautlein D., Clement F.C., Fei J., Leitenstorfer A., Ferrando-May E. & Naegeli H. (2009). Two-stage dynamic DNA quality check by xeroderma pigmentosum group C protein. *Embo Journal*, 28, 2387-2399.
- Carvalho H., Garrido L.M., Furlan R.L.A., Padilla G., Agnoletto M., Guecheva T., Henriques J.A.P., Saffi J. & Martins Menck C.F. (2010). DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 65.
- Chang D.J. & Cimprich K.A. (2009). DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol*, 5, 82-90.
- Chang D.J., Lupardus P.J. & Cimprich K.A. (2006). Monoubiquitination of proliferating cell nuclear antigen induced by stalled replication requires uncoupling of DNA polymerase and mini-chromosome maintenance helicase activities. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 32081-32088.

- Chen Y.W., Cleaver J.E., Hanaoka F., Chang C.F. & Chou K.M. (2006). A novel role of DNA polymerase eta in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents. *Molecular Cancer Research*, 4.
- Chou K.M. (2011). DNA Polymerase Eta and Chemotherapeutic Agents. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14, 2521-2529.
- Cimprich K.A. & Cortez D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 616-27.
- Cleaver J. (2005). Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *NATURE REVIEWS CANCER*, 5, 564-573.
- Cleaver J.E. (1989). Caffeine toxicity is inversely related to DNA repair in simian virus 40-transformed xeroderma pigmentosum cells irradiated with ultraviolet light. *Teratog Carcinog Mutagen*, 9, 147-55.
- Cleaver J.E. (2011). γ H2Ax: biomarker of damage or functional participant in DNA repair "all that glitters is not gold!". *Photochem Photobiol*, 87, 1230-9.
- Cleaver J.E., Feeney L. & Revet I. (2011). Phosphorylated H2Ax is not an unambiguous marker for DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, 10, 3223-4.
- Cordonnier A.M. & Fuchs R.P. (1999). Replication of damaged DNA: molecular defect in xeroderma pigmentosum variant cells. *Mutat Res*, 435, 111-9.
- Costa R., Chiganças V., Galhardo R.S., Carvalho H. & Menck C. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*, 85, 1083-99.
- Darr D. & Fridovich I. (1994). Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol*, 102, 671-5.
- Davies A.A., Huttner D., Daigaku Y., Chen S. & Ulrich H.D. (2008). Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein A. *Molecular Cell*, 29, 625-636.
- Daya-Grosjean L., James M., Drougard C. & Sarasin A. (1987). An immortalized xeroderma pigmentosum, group C, cell line which replicates SV40 shuttle vectors. *Mutat Res*, 183, 185-96.
- de Boer J. & Hoeijmakers J.H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21, 453-60.
- de Feraudy S., Revet I., Bezrookove V., Feeney L. & Cleaver J.E. (2010). A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 6870-5.
- de Groote F.H., Jansen J.G., Masuda Y., Shah D.M., Kamiya K., de Wind N. & Siegal G. (2011). The Rev1 translesion synthesis polymerase has multiple distinct DNA binding modes. *DNA Repair*, 10, 915-925.
- de Lima-Bessa K., Armelini M., Chiganças V., Jacysyn J., Amarante-Mendes G., Sarasin A. & Menck C. (2008). CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)*, 7, 303-12.
- Deans A.J. & West S.C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11, 467-480.
- Despras E., Daboussi F., Hyrien O., Marheineke K. & Kannouche P.L. (2010). ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells. *Hum Mol Genet*, 19, 1690-701.
- Deweerdk.Ea, Bootsma D. & Keijzer W. (1972). GENETIC HETEROGENEITY OF XERODERMA PIGMENTOSUM DEMONSTRATED BY SOMATIC CELL HYBRIDIZATION. *Nature-New Biology*, 238, 80-&.
- Diamant N., Hendel A., Vered I., Carell T., Reissner T., de Wind N., Geaciov N. & Livneh Z. (2012). DNA damage bypass operates in the S and G2 phases of the cell cycle and exhibits differential mutagenicity. *Nucleic Acids Res*, 40, 170-80.
- Donahue B.A., Yin S., Taylor J.S., Reines D. & Hanawalt P.C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8502-6.

- Dumaz N., Drougard C., Sarasin A. & Dayagrosjean L. (1993). SPECIFIC UV-INDUCED MUTATION SPECTRUM IN THE P53 GENE OF SKIN TUMORS FROM DNA-REPAIR-DEFICIENT XERODERMA-PIGMENTOSUM PATIENTS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 10529-10533.
- Dumstorf C.A., Clark A.B., Lin Q.C., Kissling G.E., Yuan T., Kucherlapati R., McGregor W.G. & Kunkel T.A. (2006). Participation of mouse DNA polymerase iota in strand-biased mutagenic bypass of UV photoproducts and suppression of skin cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 18083-18088.
- Dunkern T. & Kaina B. (2002). Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide excision repair-deficient Chinese hamster cells. *Mol Biol Cell*, 13, 348-61.
- Elvers I., Johansson F., Groth P., Erixon K. & Helleday T. (2011). UV stalled replication forks restart by re-priming in human fibroblasts. *Nucleic Acids Res*, 39, 7049-57.
- Enoiu M., Jiricny J. & Schärer O.D. (2012). Repair of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis. *Nucleic Acids Res*.
- Eppink B., Tafel A.A., Hanada K., van Drunen E., Hickson I.D., Essers J. & Kanaar R. (2011). The response of mammalian cells to UV-light reveals Rad54-dependent and independent pathways of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*, 10, 1095-105.
- Fagbemi A.F., Orelli B. & Schärer O.D. (2011). Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair*, 10, 722-729.
- Fei J., Kaczmarek N., Luch A., Glas A., Carell T. & Naegeli H. (2011). Regulation of Nucleotide Excision Repair by UV-DDB: Prioritization of Damage Recognition to Internucleosomal DNA. *Plos Biology*, 9.
- Friedberg E.C. (2005). Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 943-53.
- Friedberg E.C., Lehmann A.R. & Fuchs R.P. (2005). Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell*, 18, 499-505.
- Friesen C., Uhl M., Pannicke U., Schwarz K., Miltner E. & Debatin K.M. (2008). DNA-ligase IV and DNA-protein kinase play a critical role in deficient caspases activation in apoptosis-resistant cancer cells by using doxorubicin. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 3283-3289.
- Garinis G., Mitchell J., Moorhouse M., Hanada K., de Waard H., Vandeputte D., Jans J., Brand K., Smid M., van der Spek P., Hoeijmakers J., Kanaar R. & van der Horst G. (2005). Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *EMBO JOURNAL*, 24, 3952-3962.
- Gillet L.C. & Schärer O.D. (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev*, 106, 253-76.
- Graf N., Ang W.H., Zhu G., Myint M. & Lippard S.J. (2011). Role of endonucleases XPF and XPG in nucleotide excision repair of platinated DNA and cisplatin/oxaliplatin cytotoxicity. *Chembiochem*, 12, 1115-23.
- Gueranger Q., Stary A., Aoufouchi S., Faili A., Sarasin A., Reynaud C.A. & Weill J.C. (2008). Role of DNA polymerases eta, iota and zeta in UV resistance and UV-induced mutagenesis in a human cell line. *DNA Repair*, 7, 1551-1562.
- Guo C.X., Sonoda E., Tang T.S., Parker J.L., Bielen A.B., Takeda S., Ulrich H.D. & Friedberg E.C. (2006a). REV1 protein interacts with PCNA: Significance of the REV1 BRCT domain in vitro and in vivo. *Molecular Cell*, 23, 265-271.
- Guo C.X., Tang T.S., Bienko M., Parker J.L., Bielen A.B., Sonoda E., Takeda S., Ulrich H.D., Dikic I. & Friedberg E.C. (2006b). Ubiquitin-binding motifs in REV1 protein are required for its role in the tolerance of DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 8892-8900.
- Halicka H., Huang X., Traganos F., King M., Dai W. & Darzynkiewicz Z. (2005). Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cell Cycle*, 4, 339-45.

- Hanasoge S. & Ljungman M. (2007). H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*, 28, 2298-304.
- Hanawalt P.C. (2002). Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*, 21, 8949-56.
- Haracska L., Prakash L. & Prakash S. (2002). Role of human DNA polymerase kappa as an extender in translesion synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 16000-5.
- Heller R.C. & Marians K.J. (2006). Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature*, 439, 557-62.
- Heffernan T.P., Kawasumi M., Blasina A., Anderes K., Conney A.H. & Nghiem P. (2009). ATR-Chk1 pathway inhibition promotes apoptosis after UV treatment in primary human keratinocytes: potential basis for the UV protective effects of caffeine. *J Invest Dermatol*, 129, 1805-15.
- Hengartner M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-776.
- Hoeijmakers J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, 366-74.
- Hoeijmakers J.H.J. (2009). MOLECULAR ORIGINS OF CANCER DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361, 1475-1485.
- Hurley L.H. (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2, 188-200.
- Ismail I.H. & Hendzel M.J. (2008). The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ Mol Mutagen*, 49, 73-82.
- Jacobs J., Jones C. & Baille J. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*, 227, 168-70.
- Jackson S.P. & Bartek J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461, 1071-8.
- Janicijevic A., Sugawara K., Shimizu Y., Hanaoka F., Wijgers N., Djurica M., Hoeijmakers J.H.J. & Wyman C. (2003). DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B. *DNA Repair*, 2, 325-336.
- Jansen J.G., Fousteri M.I. & de Wind N. (2007). Send in the clamps: control of DNA translesion synthesis in eukaryotes. *Mol Cell*, 28, 522-9.
- Jansen J.G., Tsaalbi-Shtylik A. & de Wind N. (2009a). Functional interactions between DNA damage signaling and mutagenic translesion synthesis at post-replicative gaps. *Cell Cycle*, 8, 2857-8.
- Jansen J.G., Tsaalbi-Shtylik A., Hendriks G., Gali H., Hendel A., Johansson F., Erixon K., Livneh Z., Mullenders L.H., Haracska L. & de Wind N. (2009b). Separate domains of Rev1 mediate two modes of DNA damage bypass in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 29, 3113-23.
- Johnson R.E., Haracska L., Prakash S. & Prakash L. (2001). Role of DNA polymerase zeta in the bypass of a (6-4) TT photoproduct. *Mol Cell Biol*, 21, 3558-63.
- Johnson R.E., Kondratik C.M., Prakash S. & Prakash L. (1999). hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science*, 285, 263-265.
- Johnson R.E., Washington M.T., Haracska L., Prakash S. & Prakash L. (2000a). Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature*, 406, 1015-9.
- Johnson R.E., Washington M.T., Prakash S. & Prakash L. (2000b). Fidelity of human DNA polymerase eta. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 7447-7450.
- Jones R.M. & Petermann E. (2012). Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem J*, 443, 13-26.
- Kannouche P., Broughton B.C., Volker M., Hanaoka F., Mullenders L.H.F. & Lehmann A.R. (2001). Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes & Development*, 15, 158-172.
- Kannouche P., de Henestrosa A.R.F., Coull B., Vidal A.E., Gray C., Zicha D., Woodgate R. & Lehmann A.R. (2003). Localization of DNA polymerases eta and iota to the replication machinery is tightly co-ordinated in human cells. *Embo Journal*, 22, 1223-1233.

- Kannouche P. & Stary A. (2003). Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. *Biochimie*, 85, 1123-1132.
- Kannouche P.L. & Lehmann A.R. (2004). Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle*, 3, 1011-1013.
- Kannouche P.L., Wing J. & Lehmann A.R. (2004). Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: A possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Molecular Cell*, 14, 491-500.
- Kaufmann W.K. (2010). The human intra-S checkpoint response to UVC-induced DNA damage. *Carcinogenesis*, 31, 751-765.
- Kaufmann W.K. & Cleaver J.E. (1981). MECHANISMS OF INHIBITION OF DNA-REPLICATION BY ULTRAVIOLET-LIGHT IN NORMAL HUMAN AND XERODERMA PIGMENTOSUM FIBROBLASTS. *Journal of Molecular Biology*, 149, 171-187.
- Keizer H.G., Pinedo H.M., Schuurhuis G.J. & Joenje H. (1990). DOXORUBICIN (ADRIAMYCIN) - A CRITICAL-REVIEW OF FREE RADICAL-DEPENDENT MECHANISMS OF CYTOTOXICITY. *Pharmacology & Therapeutics*, 47.
- Kinner A., Wu W., Staudt C. & Iliakis G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*, 36, 5678-94.
- Kraemer K.H. (1997). Sunlight and skin cancer: Another link revealed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 11-14.
- Kuluncsics Z., Perdiz D., Brulay E., Muel B. & Sage E. (1999). Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J Photochem Photobiol B*, 49, 71-80.
- Lange S.S., Takata K. & Wood R.D. (2011). DNA polymerases and cancer. *Nat Rev Cancer*, 11, 96-110.
- Lehmann A.R. (1978). DNA-REPLICATION IN NORMAL AND DEFECTIVE HUMAN CELLS AFTER UV-IRRADIATION. *Journal of Supramolecular Structure*, 15-15.
- Lehmann A.R. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*, 85, 1101-11.
- Lehmann A.R. (2006). Translesion synthesis in mammalian cells. *Experimental Cell Research*, 312, 2673-2676.
- Lehmann A.R. & Fuchs R.P. (2006). Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models. *DNA Repair (Amst)*, 5, 1495-8.
- Lehmann A.R., Kirk-Bell S., Arlett C.F., Paterson M.C., Lohman P.H., de Weerd-Kastelein E.A. & Bootsma D. (1975). Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 219-23.
- Lehmann A.R., McGibbon D. & Stefanini M. (2011). Xeroderma pigmentosum. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 70.
- Li J., Uchida T., Todo T. & Kitagawa T. (2006). Similarities and differences between cyclobutane pyrimidine dimer photolyase and (6-4) photolyase as revealed by resonance Raman spectroscopy: Electron transfer from the FAD cofactor to ultraviolet-damaged DNA. *J Biol Chem*, 281, 25551-9.
- Limoli C., Giedzinski E., Bonner W. & Cleaver J. (2002). UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma -H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 233-8.
- Limoli C., Giedzinski E. & Cleaver J. (2005). Alternative recombination pathways in UV-irradiated XP variant cells. *Oncogene*, 24, 3708-14.
- Limoli C., Giedzinski E., Morgan W. & Cleaver J. (2000). Inaugural article: polymerase eta deficiency in the xeroderma pigmentosum variant uncovers an overlap between the S phase checkpoint and double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7939-46.

- Lin W.S., Xin H., Zhang Y.B., Wu X.H., Yuan F.H. & Wang Z.G. (1999). The human REV1 gene codes for a DNA template-dependent dCMP transferase. *Nucleic Acids Research*, 27, 4468-4475.
- Livneh Z., Ziv O. & Shachar S. (2010). Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. *Cell Cycle*, 9.
- Lopes M., Foiani M. & Sogo J.M. (2006). Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell*, 21, 15-27.
- Lukas J., Lukas C. & Bartek J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol*, 13, 1161-9.
- Maher V.M., Ouellette L.M., Curren R.D. & McCormick J.J. (1976). FREQUENCY OF ULTRAVIOLET LIGHT-INDUCED MUTATIONS IS HIGHER IN XERODERMA PIGMENTOSUM VARIANT CELLS THAN IN NORMAL HUMAN CELLS. *Nature*, 261, 593-595.
- Marti T., Hefner E., Feeney L., Natale V. & Cleaver J. (2006). H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 9891-6.
- Martin S., Henry C. & Cullen S. (2012). A Perspective on Mammalian Caspases as Positive and Negative Regulators of Inflammation. *Molecular Cell*, 46, 387-397.
- Masutani C., Kusumoto R., Iwai S. & Hanaoka F. (2000). Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase η . *Embo Journal*, 19, 3100-3109.
- Masutani C., Kusumoto R., Yamada A., Dohmae N., Yokoi M., Yuasa M., Araki M., Iwai S., Takio K. & Hanaoka F. (1999). The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature*, 399, 700-704.
- Matsumoto M., Yaginuma K., Igarashi A., Imura M., Hasegawa M., Iwabuchi K., Date T., Mori T., Ishizaki K., Yamashita K., Inobe M. & Matsunaga T. (2007). Perturbed gap-filling synthesis in nucleotide excision repair causes histone H2AX phosphorylation in human quiescent cells. *J Cell Sci*, 120, 1104-12.
- McCulloch S.D., Kokoska R.J., Masutani C., Iwai S., Hanaoka F. & Kunkel T.A. (2004). Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase η occurs with biased fidelity. *Nature*, 428, 97-100.
- McHugh P.J., Spanswick V.J. & Hartley J.A. (2001). Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol*, 2, 483-90.
- Mellon I., Spivak G. & Hanawalt P.C. (1987). Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*, 51, 241-9.
- Menck C. (2002). Shining a light on photolyases. *Nat Genet*, 32, 338-9.
- Meneghini R. (1976). Gaps in DNA synthesized by ultraviolet light-irradiated WI38 human cells. *Biochim Biophys Acta*, 425, 419-27.
- Miki Y., Swensen J., Shattuckeids D., Futreal P.A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q.Y., Cochran C., Bennett L.M., Ding W., Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Tran T., McClure M., Frye C., Hattier T., Phelps R., Haugenstrano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D., Stone S., Bayer S., Wray C., Bogden R., Dayananth P., Ward J., Tonin P., Narod S., Bristow P.K., Norris F.H., Helvering L., Morrison P., Rosteck P., Lai M., Barrett J.C., Lewis C., Neuhausen S., Cannonalbright L., Goldgar D., Wiseman R., Kamb A. & Skolnick M.H. (1994). A STRONG CANDIDATE FOR THE BREAST AND OVARIAN-CANCER SUSCEPTIBILITY GENE BRCA1. *Science*, 266, 66-71.
- Misteli T. & Soutoglou E. (2009). The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 243-54.
- Mitchell D.L. (1988). The induction and repair of lesions produced by the photolysis of (6-4) photoproducts in normal and UV-hypersensitive human cells. *Mutat Res*, 194, 227-37.
- Moser J., Kool H., Giakzidis I., Caldecott K., Mullenders L.H.F. & Foustieri M.I. (2007). Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Molecular Cell*, 27, 311-323.

- Murakumo Y., Ogura Y., Ishii H., Numata S., Ichihara M., Croce C.M., Fishel R. & Takahashi M. (2001). Interactions in the error-prone postreplication repair proteins hREV1, hREV3, and hREV7. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 35644-35651.
- Naegeli H. & Sugasawa K. (2011). The xeroderma pigmentosum pathway: Decision tree analysis of DNA quality. *DNA Repair*, 10, 673-683.
- Naryzhny S.N. (2008). Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 3789-3808.
- Novarina D., Amara F., Lazzaro F., Plevani P. & Muzi-Falconi M. (2011). Mind the gap: keeping UV lesions in check. *DNA Repair (Amst)*, 10, 751-9.
- Olive P.L. & Banáth J.P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*, 1, 23-9.
- Ogi T., Limsirichaikul S., Overmeer R.M., Volker M., Takenaka K., Cloney R., Nakazawa Y., Niimi A., Miki Y., Jaspers N.G., Mullenders L.H.F., Yamashita S., Foustari M.I. & Lehmann A.R. (2010). Three DNA Polymerases, Recruited by Different Mechanisms, Carry Out NER Repair Synthesis in Human Cells. *Molecular Cell*, 37, 714-727.
- Ortolan T. (2008) Prevenindo a instabilidade do genoma através dos mecanismos de reparo de DNA
- Petermann E. & Helleday T. (2010). Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 683-7.
- PETTIJOHN D. & HANAWALT P. (1964). EVIDENCE FOR REPAIR-REPLICATION OF ULTRAVIOLET DAMAGED DNA IN BACTERIA. *J Mol Biol*, 9, 395-410.
- Pfeifer G. (1997). Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem Photobiol*, 65, 270-83.
- Piette J., Merville-Louis M.P. & Decuyper J. (1986). Damages induced in nucleic acids by photosensitization. *Photochem Photobiol*, 44, 793-802.
- Prakash S., Johnson R.E. & Prakash L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem*, 74, 317-53.
- Prakash S. & Prakash L. (2002). Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev*, 16, 1872-83.
- Pustisek N. & Situm M. (2011). UV-Radiation, Apoptosis and Skin. *Collegium Antropologicum*, 35, 339-341.
- RASMUSSEN R.E. & PAINTER R.B. (1964). EVIDENCE FOR REPAIR OF ULTRAVIOLET DAMAGED DEOXYRIBONUCLEIC ACID IN CULTURED MAMMALIAN CELLS. *Nature*, 203, 1360-2.
- Rass E., Grabarz A., Bertrand P. & Lopez B.S. (2012). [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiother*, 16, 1-10.
- Rastogi R.P., Richa, Kumar A., Tyagi M.B. & Sinha R.P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids*, 2010, 592980.
- Rey L., Sidorova J.M., Puget N., Boudsocq F., Biard D.S., Monnat R.J., Cazaux C. & Hoffmann J.S. (2009). Human DNA polymerase eta is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication. *Mol Cell Biol*, 29, 3344-54.
- Riou L., Zeng L., Chevallier-Lagente O., Sary A., Nikaido O., Taïeb A., Weeda G., Mezzina M. & 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, 1125-33.
- Rogakou E., Boon C., Redon C. & Bonner W. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, 146, 905-16.
- Rogakou E., Pilch D., Orr A., Ivanova V. & Bonner W. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273, 5858-68.
- Rupp W.D. & Howard-Flanders P. (1968). Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. *J Mol Biol*, 31, 291-304.

- Saffi J., Agnoletto M.H., Guecheva T.N., Batista L.F., Carvalho H., Henriques J.A., Stary A., Menck C.F. & Sarasin A. (2010). Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)*, 9, 40-7.
- Sale J.E., Lehmann A.R. & Woodgate R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 141-52.
- Sarasin A. (1999). The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutat Res*, 428, 5-10.
- Sertic S., Pizzi S., Lazzaro F., Plevani P. & Muzi-Falconi M. (2012). NER and DDR: Classical music with new instruments. *Cell Cycle*, 11, 668-74.
- Schlacher K., Wu H. & Jasin M. (2012). A Distinct Replication Fork Protection Pathway Connects Fanconi Anemia Tumor Suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell*, 22, 106-116.
- SETLOW R.B. & CARRIER W.L. (1964). THE DISAPPEARANCE OF THYMINE DIMERS FROM DNA: AN ERROR-CORRECTING MECHANISM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51, 226-31.
- Shachar S., Ziv O., Avkin S., Adar S., Wittschieben J., Reissner T., Chaney S., Friedberg E.C., Wang Z., Carell T., Geacintov N. & Livneh Z. (2009). Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J*, 28, 383-93.
- Shiloh Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, 3, 155-68.
- Spencer D.M.S., Bilardi R.A., Koch T.H., Post G.C., Nafie J.W., Kimura K.-I., Cutts S.M. & Phillips D.R. (2008). DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: A role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 638.
- Stary A., Kannouche P., Lehmann A.R. & Sarasin A. (2003). Role of DNA polymerase eta in the UV mutation spectrum in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 18767-18775.
- Stary A. & Sarasin A. (2002). The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome. *Biochimie*, 84, 49-60.
- Sugasawa K., Ng J.M.Y., Masutani C., Iwai S., van der Spek P.J., Eker A.P.M., Hanaoka F., Bootsma D. & Hoeijmakers J.H.J. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Molecular Cell*, 2, 223-232.
- Svoboda D.L., Briley L.P. & Vos J.M.H. (1998). Defective bypass replication of a leading strand cyclobutane thymine dimer in xeroderma pigmentosum variant cell extracts. *Cancer Research*, 58, 2445-2448.
- Swift L.P., Rephaeli A., Nudelman A., Phillips D.R. & Cutts S.M. (2006). Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Research*, 66.
- Temviriyankul P., van Hees-Stuivenberg S., Delbos F., Jacobs H., de Wind N. & Jansen J.G. (2012). Temporally distinct translesion synthesis pathways for ultraviolet light-induced photoproducts in the mammalian genome. *DNA Repair (Amst)*, 11, 550-8.
- Tissier A., Kannouche P., Reck M.P., Lehmann A.R., Fuchs R.P.P. & Cordonnier A. (2004). Co-localization in replication foci and interaction of human Y-family members, DNA polymerase pol eta and REV1 protein. *DNA Repair*, 3, 1503-1514.
- Tornaletti S. & Hanawalt P.C. (1999). Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie*, 81, 139-46.
- Ummat A., Rechkoblit O., Jain R., Roy Choudhury J., Johnson R.E., Silverstein T.D., Buku A., Lone S., Prakash L., Prakash S. & Aggarwal A.K. (2012). Structural basis for cisplatin DNA damage tolerance by human polymerase η during cancer chemotherapy. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 628-32.
- van Gent D.C., Hoeijmakers J.H. & Kanaar R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, 2, 196-206.

- Vrouwe M.G., Pines A., Overmeer R.M., Hanada K. & Mullenders L.H. (2011). UV-induced photolesions elicit ATR-kinase-dependent signaling in non-cycling cells through nucleotide excision repair-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci*, 124, 435-46.
- Wang Y., Woodgate R., McManus T.P., Mead S., McCormick J.J. & Maher V.M. (2007). Evidence that in xeroderma pigmentosum variant cells, which lack DNA polymerase eta, DNA polymerase iota causes the very high frequency and unique spectrum of UV-induced mutations. *Cancer Research*, 67, 3018-3026.
- Wang J., Gong Z. & Chen J. (2011). MDC1 collaborates with TopBP1 in DNA replication checkpoint control. *J Cell Biol*, 193, 267-73.
- Ward I. & Chen J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, 276, 47759-62.
- Ward I., Minn K. & Chen J. (2004). UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress. *J Biol Chem*, 279, 9677-80.
- Widlak P. & Garrard W. (2009). Roles of the Major Apoptotic Nuclease-DNA Fragmentation Factor-in Biology and Disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 263-274.
- Willmore E., de Caux S., Sunter N.J., Tilby M.J., Jackson G.H., Austin C.A. & 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.
- Yamada A., Masutani C., Iwai S. & Hanaoka F. (2000). Complementation of defective translesion synthesis and UV light sensitivity in xeroderma pigmentosum variant cells by human and mouse DNA polymerase eta. *Nucleic Acids Research*, 28, 2473-2480.
- Yan S. & Michael W.M. (2009). TopBP1 and DNA polymerase alpha-mediated recruitment of the 9-1-1 complex to stalled replication forks: implications for a replication restart-based mechanism for ATR checkpoint activation. *Cell Cycle*, 8, 2877-84.
- Yoon J.H., Prakash L. & Prakash S. (2010). Error-free replicative bypass of (6-4) photoproducts by DNA polymerase zeta in mouse and human cells. *Genes Dev*, 24, 123-8.
- You Y.H., Lee D.H., Yoon J.H., Nakajima S., Yasui A. & Pfeifer G.P. (2001). Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem*, 276, 44688-94.
- You Z.Z., Kong L. & Newport J. (2002). The role of single-stranded DNA and polymerase alpha in establishing the ATR, Hus1 DNA replication checkpoint. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 27088-27093.
- Yue J., Lan S., Yuan C. & Shen Z. (2012). Prognostic Values of Filamin-A Status for Topoisomerase II Poison Chemotherapy. *International Journal of Biological Sciences*, 8, 442-450.
- Ziv O., Geacintov N., Nakajima S., Yasui A. & Livneh Z. (2009). DNA polymerase zeta cooperates with polymerases kappa and iota in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 11552-7.
- Zunino F. & Capranico G. (1990). DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des*, 5, 307-17.

ANNEXES

DNA polymerase η is critical for human Xeroderma Pigmentosum group C recover from low-dose UVC irradiation

Quinet, A^{1,2}; Vessoni, AT²; Biard, D³; Menck, CFM²; Sarasin, A¹; Stary, A¹

¹Genetic Stability and Oncogenesis Laboratory, UMR8200/CNRS, Paris-Sud University, Gustave Roussy Institute, Villejuif, France; ² Department of Microbiology, University of São Paulo, S.P., Brazil; ³CEA, DSV-iMETI-SEPIA, Fontenay-aux-Roses, France

Abstract

UV-induced DNA damage, such as (6-4) photoproducts (6-4PPs) and cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), interferes with DNA replication and transcription. These types of DNA damage can be removed by nucleotide excision repair (NER) or tolerated by translesion DNA synthesis (TLS). Polymerase η (Pol η) is responsible for bypassing CPDs, although it may also act on 6-4PP lesions. Here, we determine the role of Pol η in UV-irradiated NER-deficient human XP-C cells. By knocking down (KD) the POLH gene in XP-C cells, we created a stable human cell line, XP-C/Pol η ^{KD}, that exhibited both the XP-C and XP-V phenotypes. The colocalization of γ H2AX with RPA, as shown by immunofluorescence, revealed UV-induced single-stranded DNA (ssDNA) in both XP-C and XP-C/Pol η ^{KD} cells. Flow cytometry analyses of γ H2AX showed ssDNA in both the S and G2 phases in these two cell lines. The incorporation of BrdU after UV irradiation showed that XP-C cells accumulated in the G2 phase but not in the S phase. Because CPDs can be bypassed by Pol η in XP-C cells, the data suggest that TLS of 6-4PPs does not occur at the replication fork but instead occurs as a post-replicative gap-filling mechanism. Moreover, Pol η silencing led to S-phase arrest, DNA strand breaks and cell death in UV-irradiated XP-C cells, demonstrating a critical role for Pol η in cells with a NER-deficient background. The compelling data highlight a complex crosstalk between NER and TLS in response to UV irradiation.

Introduction

UV light induces DNA damage that can block replication and transcription (1-3) and may result in cell death or genetic instability. These lesions are removed via the nucleotide excision repair (NER) pathway, defects in which may cause xeroderma pigmentosum (XP), a syndrome characterized by UV hypersensitivity (1). The NER pathway is subdivided into global genome repair (GGR) and transcription-coupled repair (TCR) (4). Briefly, GGR resolves lesions throughout the genome that are recognized by the XPC protein (3), whereas TCR targets lesions that stall RNA polymerase II. UV irradiation induces mainly (6-4) photoproducts (6-4PPs) and cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) in the DNA. Although 6-4PPs are formed 3 times less frequently than CPDs, they provoke a more pronounced distortion in the DNA helix and are therefore removed within 3-6 hours. In contrast, only 50% of CPDs are excised 24 hours after UV exposure (3, 5).

Alternatively, UV damage can be tolerated by translesion DNA synthesis (TLS), in which translesion polymerases (TLS pols) replicate damaged DNA (6). TLS can occur at the replication fork or via a post-replicative mechanism (7). In the former, the stalled replicative pol is replaced by a TLS pol that inserts nucleotides opposite the lesion. The replicative pol is reassembled to allow the resumption of DNA replication after the lesion is bypassed. According to another hypothesis, the replicative pol reinitiates after the damage, giving rise to short single-stranded gaps opposite the lesion. These gaps would then be filled by TLS pols after the resumption of replication forks (7-11) in a post-replicative gap-filling mechanism. DNA polymerase η (Pol η) is the prototypic TLS pol whose importance in human cells is highlighted by the variant form of XP (XP-V). Pol η ensures accurate replication of TT-CPDs. This bypass may occur at the replication fork (8, 12) but also may occur via a post-replicative gap-filling pathway (13, 14). Pol η is also involved in the bypass of 6-4PPs in plasmids in both yeast and human cells (15, 16). However, a recent work suggested that Pol η is mainly restricted to the TLS of CPDs (17), and the authors proposed that the bypass of 6-4PPs in the mammalian genome is performed by Rev1 and Pol ζ (17). Therefore, the role of Pol η in the TLS of 6-4PPs remains controversial.

In this work, we investigated the importance of Pol η in the recovery of UV-exposed, XPC-deficient human cells in which most of the 6-4PPs and CPDs were not repaired. Cell cycle analysis showed that UV treatment of XP-C cells did not arrest DNA replication but instead caused cells to accumulate in the G2 phase. The XP-C cells showed the phosphorylation of the histone H2AX (γ H2AX) in the S and G2 phases after UV exposure. γ H2AX was found to be co-localized with RPA in immunofluorescence assays, showing an association of γ H2AX with single-stranded DNA (ssDNA). Our data from XP-C cells indicate that the presence of UV-induced ssDNA during the S and G2 phases signals checkpoint activation and G2 arrest. Because CPDs are efficiently bypassed by Pol η in XP-C cells, this work provides evidence for the post-replicative gap-filling bypass of 6-4PPs. By knocking down (KD) the POLH gene in XP-C cells, we established a human cell line that exhibited an enhanced sensitivity to UVC. In strong contrast to what occurs in XP-C cells, low-dose UVC irradiation generated DNA strand breaks and significant cell death in the double-deficient mutant cells, demonstrating that Pol η plays a crucial role in the recovery of GGR-deficient cells that are exposed to UVC. The Pol η KD induced a more pronounced γ H2AX signal and an S-phase arrest in XP-C cells. Together, the results also indicate that Pol η may participate in the replication of 6-4PP lesions in human cells.

Results

XP-C cells are temporarily arrested at the G2 phase after low-dose UVC irradiation

To study the DNA damage response (DDR) in XP-C fibroblasts, the effects of a low UVC dose were investigated. Flow cytometry showed that up to 7 h after a dose of 2 J/m² UVC, the

percentage of S-phase cells increased in both XP-C⁺ and XP-C fibroblasts (Fig. 1A). At 24 h, despite resumption of a normal cell cycle progression in NER⁺ cells, we observed a two fold increase in the number of XP-C fibroblasts in the G2 phase relative to control cells (Fig. 1). Cell cycle arrest in XP-C cells was less pronounced 72 h after UVC exposure, and low levels of DNA fragmentation (8.5 % of sub-G1) were also detected (Fig.1A). Interestingly, 24 h after 2 J/m² of irradiation, XP-C cells showed neither a reduced BrdU incorporation nor cell accumulation in the S phase (Fig.1B), indicating that DNA replication proceeded normally. Therefore, upon a low UVC dose, XP-C cells were temporarily arrested in the G2 phase of the cell cycle, but following a higher UVC dose (5 J/m²), XP-C cells accumulated in both the late S and G2 phases (Fig. 1B).

Persistent H2AX phosphorylation in XP-C fibroblasts

The histone H2AX is phosphorylated at serine 139 (forming γ H2AX) in the vicinity of DNA single or double strand breaks (SSBs and DSBs, respectively) (18, 19). Because UV irradiation induces γ H2AX formation (19-23), this was investigated in XP-C cells after UVC exposure. Immediately after a local irradiation of 150 J/m² UVC, γ H2AX staining was not detected, but CPD specific signals were intense (Fig. S1). Beginning at 2 h post-treatment, γ H2AX staining colocalized with CPDs and 6-4PPs in XP-C cells. Thus, γ H2AX was induced by the presence of both CPD and 6-4PP lesions. Next, we assessed the phosphorylation of H2AX after low-dose UVC exposure (Fig. 2). Flow cytometry of the γ H2AX signal as a function of the DNA content as shown by propidium iodide staining revealed that 2 h after exposure to 2 J/m² UVC, γ H2AX staining increased in the S and G2 phases in both XP-C⁺ and XP-C fibroblasts (Fig. 2). At 24 h after UV irradiation, γ H2AX staining was no longer detected in XP-C⁺ cells but increased in all phases of the XP-C cell cycle. A slight decrease in staining intensity was detected 72 h after UVC treatment, though it did not return to its basal level. These data suggest that γ H2AX was linked to the presence of unrepaired photoproducts in all phases of the cell cycle in XP-C cells.

Human cells deficient in both XPC and Pol η are highly sensitive to UVC irradiation

We next sought to determine the role of Pol η in UVC-irradiated human XP-C cells. Pol η was stably knocked down (Pol η ^{KD}) in XP-C fibroblasts using an EBV-derived vector targeting the POLH gene (24, 25), and from among these cells, the clone with the highest KD efficiency was selected (Fig. 3A). The proliferation rate of fibroblasts was disrupted to a greater extent in the XP-C/Pol η ^{KD} cells than in the XP-C cells after a 2 J/m² UVC dose (Fig. 3B and S2), indicating that Pol η ^{KD} further increased the sensitivity of XP-C cells to UVC irradiation. UV sensitization by caffeine (CAF) is a hallmark of the XP-V cell phenotype (9, 26, 27). Therefore, to functionally access the Pol η KD, we evaluated the sensitivity of XP-C/Pol η ^{KD} cells to UVC irradiation in the presence of 1 mM CAF (Fig. 3B). The proliferation of XP-C⁺ cells was not affected by this drug, but the proliferation of XP-C, XP-V and XP-C/Pol η ^{KD} fibroblasts was significantly decreased after treatment with low UVC doses (2 and 3 J/m²) in the presence of

CAF. However, consistent with the defect of Pol η in XP-C/Pol η ^{KD} cells, only XP-V and XP-C/Pol η ^{KD} cells were sensitized by CAF after being irradiated with 1 J/m² UVC. To better characterize the UV-DDR in this double-deficient cell line, the cell cycle and sub-G1 phase were analyzed by flow cytometry (Fig. 3C and D). At 24 h post-2 J/m² UVC treatment, XP-C/Pol η ^{KD} fibroblasts accumulated in both the G2 and S phases, while XP-C (Fig. 1B) and XP-V cells accumulated in the G2 or S phase, respectively. At 72 h, BrdU incorporation into DNA in the double mutant showed a disrupted S-to-G2 phase transition and an enhanced accumulation of cells in the G2 phase. However, XP-V cells accumulated moderately in the G2 phase (Fig. 3C), and XP-C/Pol η ^{KD} exhibited a significant sub-G1 fraction (22%) that was not observed for XP-V cells (Fig. 3D). Upon a higher UVC dose (5 J/m²), XP-V cells clearly accumulated in the early S phase, while XP-C/Pol η ^{KD} cell accumulation in the S and G2 phases was enhanced and these cells showed a dramatic decrease in BrdU incorporation (Fig. 3C). Altogether, these results indicate that human fibroblasts deficient in both XPC and Pol η presented the combined XP-C and XP-V phenotypes and were extremely sensitive to low-dose UVC irradiation.

Low-dose UVC exposure induces pronounced H2AX phosphorylation and DNA single-strand breaks in XP-C/Pol η ^{KD} human cells

Quantification of γ H2AX by flow cytometry showed that XP-C/Pol η ^{KD} cells exhibited two fold more γ H2AX-positive cells than XP-C and XP-V fibroblasts 24 h after a 2 J/m² UVC dose (Fig. 4A). In XP-V cells, γ H2AX accumulated mainly in the S-phase 24 h after irradiation and disappeared thereafter (Fig. 4B). XP-C/Pol η ^{KD} fibroblasts showed an increase in γ H2AX signal in all cell cycle phases (Fig. 4B). Interestingly, a more intense γ H2AX staining (>10e2 in log FITC, see Fig. 4B), defined by Cleaver et al. as indicative of high levels of γ H2AX (28, 29), was detected in only this cell line. This signal arose in the S and G2 phases 24 h after UVC treatment and was present in all cell cycle phases 72 h later. The relevance of γ H2AX staining in the detection of DNA strand breaks was analyzed by the alkaline comet assay, which detects both SSBs and DSBs. Surprisingly, at 24 h after a 2 J/m² UVC treatment, when γ H2AX staining was at a maximum for all three mutant cell lines, DNA breaks were significantly induced in only the Pol η -deficient cell lines and not in the XP-C fibroblasts (Fig. 4C and S3). Importantly, no DNA breaks were detected immediately after UVC exposure, indicating that they were not directly induced by this irradiation (Fig. S3). To distinguish between SSBs and DSBs, we next assessed DSB formation using the neutral comet assay. As comet tail moments under alkaline and neutral conditions are not directly comparable (30), we determined the percentage of cells with comet tails for each experiment (Fig. 4C, see Fig. S4 for more details). Upon a 2 J/m² UVC dose, approximately 8% of XP-V cells exhibited tails under alkaline conditions (versus 4% of untreated cells), while only 4% of cells exhibited DSBs as shown by the neutral assay (versus 2.4% of unirradiated cells). Interestingly, 24% of XP-C/Pol η ^{KD} cells presented tails in the alkaline comet assay after a 2 J/m² UVC dose (versus 4% of untreated cells), but only 9% of

these cells exhibited DSBs (versus 3.4% of mock-treated cells). Thus, a low UVC dose induced both SSBs and DSBs in the XP-C/Pol η ^{KD} cell lines; SSBs, however, accounted for the majority of the DNA breaks. SSBs were also induced in XP-V cells, although they were much more pronounced in the double-deficient cell line. Because SSBs may reflect single-stranded DNA (ssDNA) in the complementary DNA strand, we used immunofluorescence to follow the localization of γ H2AX with replication protein A (RPA), a protein that binds ssDNA. (Fig. 4D). Strikingly, γ H2AX and RPA colocalized in all cell lines 7 h after local UV treatment. Therefore, in XP-C cells, UVC irradiation induced γ H2AX to localize at ssDNA sites despite no significant amount of SSBs or DSBs being detected by the comet assay. Moreover, in XP-C/Pol η ^{KD} human fibroblasts, a low UVC dose induced enhanced γ H2AX staining in all of the cell cycle phases. This staining was more pronounced in cells in the S and G2 phases because they also had high levels of γ H2AX. Furthermore, in this double-deficient mutant, UV irradiation generated DSBs and to a greater extent SSBs.

CAF induces high levels of γ H2AX and DNA double-strand breaks in XPC- and Pol η -deficient fibroblasts after a low UVC dose

Surprisingly, the proliferation of XP-C cells exposed to 2 J/m² of UVC was disturbed by CAF (Fig. 3B). Therefore, we further investigated the effects of CAF in irradiated mutant cell lines. First, quantitative flow cytometry revealed that, in all deficient fibroblasts, this treatment drastically impaired DNA synthesis and enhanced DNA fragmentation. This effect was even more pronounced for XP-C/Pol η ^{KD} cells (Fig. S5). CAF also increased the UV-induced γ H2AX staining in all mutant cell lines at 24 h and further increased it 72 h after treatment (Fig. 5A and S6). Interestingly, the CAF-induced increase in the percentage of γ H2AX-positive cells was caused by an increase in the high levels of γ H2AX (Fig. 5A). Cells with high levels of γ H2AX were mainly in the S and G2 phases 24 h after treatment and were in all phases of the cell cycle 72 h later (Fig. S7). Interestingly, CAF also increased UV-induced SSBs and DSBs in XP-V and XP-C/Pol η ^{KD} cells 24 h after treatment (Fig. 5B and 4C). Indeed, CAF more than doubled the generation of SSBs and DSBs in these irradiated cells compared to UV-irradiated cells not treated with CAF. Moreover, this treatment provoked DNA breaks in XP-C cells, as indicated by the 16.3% and 12% of XP-C cells with tails under alkaline and neutral conditions, respectively (Fig. 5B). Together, the data show that CAF enhanced UVC-induced DNA replication arrest, production of DSBs and high levels of γ H2AX and the size of the sub-G1 fraction in XP-V and XP-C/Pol η ^{KD} cells. In irradiated XP-C cells, on the other hand, S phase stalling, high levels of γ H2AX and DNA breaks appeared only in the presence of CAF.

Discussion

Pol η deficiency does not lead to hypersensitivity to UV light except in the presence of caffeine (26, 27). However, we show here that in an XPC deficient background, Pol η -deficient cells are highly sensitive to UV irradiation, underscoring the importance of Pol η in the recovery of

human XP-C cells exposed to UV light. To gain further insights into the potential role of Pol η in human XP-C cells, we studied the low dose UV-DDR in XP-V and XP-C cells as well as in a novel Pol η -knocked down XP-C cell line.

Quantitative flow cytometry showed that irradiated XP-V fibroblasts were arrested during replication and presented γ H2AX staining in this phase of the cell cycle. UV-induced γ H2AX in Pol η -deficient cells has been previously associated with the generation of single-stranded DNA (ssDNA) caused by the stalling of DNA replication forks (12). Indeed, by using both the comet assay and immunofluorescence in XP-V cells, we demonstrated that a low UVC dose induces ssDNA not double-strand breaks (DSBs).

Because most CPDs and 6-4PPs are not repaired in XP-C cells, we were surprised to find that low-dose UV irradiation did not induce S-phase arrest but instead resulted in an accumulation of cells in the G2 phase. Moreover, γ H2AX was linked to the presence of ssDNA in XP-C and was formed in the G2 phase as well as during replication. Recently, it was shown that UV-induced changes in DNA structure in the S and G2 phases are triggers for checkpoint activation (13, 31), which depends mostly on the ATR (ataxia telangiectasia mutated, ATM and Rad-3 related) pathway (17, 32). When the ATR pathway was inhibited by CAF (12, 14, 28), XP-C as XP-V cells were highly sensitized to low-dose UVC exposure. Our observations are consistent with the formation of single-stranded gaps in the DNA from UV-exposed XP-C cells in the S and G2 phases, which activates the ATR pathway and leads to G2 arrest. Moreover, the differences between XP-V and XP-C cells cycle and the formation of γ H2AX as a function of the cell cycle indicate that, under our experimental conditions, the UV-DDR observed in XP-C cells is due to the persistence of 6-4PPs rather than CPDs. These conclusions support a model in which 6-4PP lesions are bypassed through a post-replicative gap-filling process. Similarly, in XP-V cells, UV irradiation induced a slight cell cycle arrest in the G2 phase 72 h after treatment. This result suggests a post-replicative gap-filling backup mechanism for the bypass of CPDs in the absence of Pol η .

Because Pol η is able to insert the first nucleotide during bypass of 6-4PPs (15, 16), in Pol η -deficient cells, unrepaired 6-4PPs would stall replication forks and cause them to become a predominant source of DSBs (17). Therefore, to explain the critical importance of Pol η in the XP-C cells reported here, we speculate that in the absence of Pol η , 6-4PPs arrest replication forks in the double-deficient mutant in a similar manner to what is observed for CPDs in XP-V cells. Our work supports the model proposed by Jansen et al. (8), in which the TLS of 6-4PPs occurs in a post-replicative gap-filling manner beginning with the insertion of the first nucleotide by Pol η . In the absence of Pol η , part of the stalled replication forks at a 6-4PP would be resolved by a slow post-replicative gap-filling mechanism, while the other would be processed into a DSB. Nevertheless, we cannot completely rule out the possibility that the persistence of unrepaired CPDs amplifies the XP-V phenotype in XPC/Pol η ^{KD} fibroblasts.

Further investigations are needed to assess the importance of Pol η in the specific bypass of 6-4PPs in human cells.

Because H2AX can be phosphorylated by ATR (20), it is intriguing that the inhibition of this kinase by CAF induced an increase in γ H2AX formation after UV irradiation. A recent work has shown that γ H2AX may be involved in the amplification of ATR signaling (33). Thus, H2AX may be phosphorylated in response to ssDNA, inducing an over-activation of the ATR pathway and stabilizing ssDNA (12, 34). Interestingly, this increase in γ H2AX corresponded to the high levels of γ H2AX previously described by Cleaver (23, 28). Higher levels of γ H2AX probably appear as a consequence of DSBs as they were detected by the neutral comet assay under the same experimental conditions. In addition, CAF and UV exposure together redirect S phase cells into an apoptotic pathway mediated by ATM and JNK1 (28, 29, 35). Here, UV-exposed S phase cells are likely switched to a DSB pathway that is known to activate ATM signaling and to induce intense γ H2AX staining (23). In this study, the high correlation of DSB formation with apoptosis indicates that the majority of UV-induced DSBs cannot be repaired, resulting in cell death. Importantly, the same results were observed for the XP-C/Pol η ^{KD} cells that were exposed to a low UVC dose even in the absence of CAF, further indicating a critical role for Pol η in the recovery of UV-irradiated human XP-C cells.

This study revealed that a post-replicative gap-filling bypass mechanism may play an important role in the recovery of human XP-C cells from UV exposure. Our work revealed unforeseen roles for 6-4PPs in the generation of such gaps in the human genome. Moreover, we demonstrated that Pol η is crucial when UV lesions are not removed by GGR. Further investigations will be performed to establish the role of Pol η in the bypass of 6-4PPs. Although the effects observed in this work were certainly exacerbated by DNA repair defects, these processes probably reflect the consequences of a small number of lesions in human cells and disclose the crosstalk between NER and TLS by Pol η as it deals with UV-induced photoproducts. The establishment of a stable XP-C/Pol η ^{KD} human cell line has also paved the way to further investigations regarding the relationship between NER and TLS in response to several other genotoxic agents. This approach may lead to significant improvements in our understanding of mutagenesis and genetic instability mechanisms.

Material and methods

Cell lines, cell culture conditions and gene silencing

The SV40-transformed human fibroblasts XP4PA (XP-C), XP30RO (XP-V, kindly gifted by Dr. James Cleaver), MRC5, XP4PA corrected for XPC mutation (XP-C⁺) and XP-C/Pol η ^{KD} were routinely grown in DMEM (LGC) supplemented with 10% FCS (Cultilab) and 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere (36). POLH was stably knocked down in XP-C human fibroblasts by an EBV-derived vector as previously reported (24, 25). For details, see SI Materials and Methods.

Treatments

UVC irradiation (254 nm) and caffeine treatment were performed as previously described (12).

Cell proliferation

Cell proliferation was assessed 72 h after UVC irradiation with or without caffeine using a Cell Proliferation Kit II (XTT, Roche, Basel, Switzerland) as described elsewhere (36).

Flow cytometry (sub-G1, cell cycle and γ H2AX analyses)

Cell cycle, sub-G1 and γ H2AX analyses were performed using flow cytometry. To study cell cycle distribution, cells were incubated with BrdU 20 minutes prior to harvesting and were stained with BrdU to show DNA content as previously described (12). The protocols for the analysis of sub-G1 and γ H2AX were described elsewhere (36) and are detailed in the SI Materials and Methods.

Immunofluorescence

For local UV irradiation, cells were covered with a 5 μ m pore-diameter filter (Millipore) during exposure, and immunostaining was subsequently performed as previously described (37) with the addition of a treatment with 2 M HCl for 10 minutes at 37°C prior to blocking. The following antibodies were used: rabbit anti- γ H2AX (ab-2893 Abcam, Cambridge, MA, USA), mouse anti-RPA p34 (Neomarkers, Fremont, CA, USA) and mouse anti- γ H2AX (Millipore).

Western Blots

The detection of endogenous proteins was performed as previously described (12). The following antibodies were used: rabbit anti-Pol η (ab-17725), mouse anti-XPC (ab-6264) and mouse anti-GAPDH (sc-32233 Santa Cruz, CA, USA).

Alkaline and neutral comet assays

The detection of DNA breaks was performed as previously described (38), and details are included in the SI Materials and Methods section. At least 100 comets per slide were scored with Comet Assay IV software (Perceptive instruments).

Statistics

Statistical significance was assessed using a t-test or two-way ANOVA followed by the Bonferroni test (Prism 5, GraphPad Software Inc., CA, USA).

Acknowledgements The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brazil), Centre National de Recherche Scientifique (CNRS, France) and Association Française de Myopathie (Evry, France) for Grant support. ATV had a fellowship from FAPESP and AQ had a fellowship from French government (MESR).

References

1. Cleaver J (2005) Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *NATURE REVIEWS CANCER* 5(7):564-573.

2. Hoeijmakers J (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411(6835):366-374.
3. Costa R, Chiganças V, Galhardo RS, Carvalho H, & Menck C (2003) The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85(11):1083-1099.
4. Hanawalt PC (2002) Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21(58):8949-8956.
5. Tornaletti S & Pfeifer G (1996) UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays* 18(3):221-228.
6. Sale JE, Lehmann AR, & Woodgate R (2012) Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(3):141-152.
7. Lehmann AR & Fuchs RP (2006) Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models. *DNA Repair (Amst)* 5(12):1495-1498.
8. Jansen JG, Foustari MI, & de Wind N (2007) Send in the clamps: control of DNA translesion synthesis in eukaryotes. *Mol Cell* 28(4):522-529.
9. Lehmann AR, et al. (1975) Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(1):219-223.
10. Lopes M, Foiani M, & Sogo JM (2006) Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell* 21(1):15-27.
11. Meneghini R (1976) Gaps in DNA synthesized by ultraviolet light-irradiated WI38 human cells. *Biochim Biophys Acta* 425(4):419-427.
12. Despras E, Daboussi F, Hyrien O, Marheineke K, & Kannouche PL (2010) ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells. *Hum Mol Genet* 19(9):1690-1701.
13. Diamant N, et al. (2012) DNA damage bypass operates in the S and G2 phases of the cell cycle and exhibits differential mutagenicity. *Nucleic Acids Res* 40(1):170-180.
14. Elvers I, Johansson F, Groth P, Erixon K, & Helleday T (2011) UV stalled replication forks restart by re-priming in human fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 39(16):7049-7057.
15. Yoon JH, Prakash L, & Prakash S (2010) Error-free replicative bypass of (6-4) photoproducts by DNA polymerase zeta in mouse and human cells. *Genes Dev* 24(2):123-128.
16. Bresson A & Fuchs RP (2002) Lesion bypass in yeast cells: Pol eta participates in a multi-DNA polymerase process. *EMBO J* 21(14):3881-3887.
17. Temviriyankul P, et al. (2012) Temporally distinct translesion synthesis pathways for ultraviolet light-induced photoproducts in the mammalian genome. *DNA Repair (Amst)* 11(6):550-558.
18. Rogakou E, Pilch D, Orr A, Ivanova V, & Bonner W (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273(10):5858-5868.
19. Vrouwe MG, Pines A, Overmeer RM, Hanada K, & Mullenders LH (2011) UV-induced photolesions elicit ATR-kinase-dependent signaling in non-cycling cells through nucleotide excision repair-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci* 124(Pt 3):435-446.
20. Ward I & Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276(51):47759-47762.
21. Limoli C, Giedzinski E, Bonner W, & Cleaver J (2002) UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma -H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1):233-238.
22. Marti T, Hefner E, Feeney L, Natale V, & Cleaver J (2006) H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(26):9891-9896.
23. Cleaver JE, Feeney L, & Revet I (2011) Phosphorylated H2Ax is not an unambiguous marker for DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 10(19):3223-3224.

24. Biard D, Despras E, Sarasin A, & Angulo J (2005) Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimick human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* 3(9):519-529.
25. Rey L, et al. (2009) Human DNA polymerase eta is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication. *Mol Cell Biol* 29(12):3344-3354.
26. Cordonnier AM & Fuchs RP (1999) Replication of damaged DNA: molecular defect in xeroderma pigmentosum variant cells. *Mutat Res* 435(2):111-119.
27. Arlett CF, Harcourt SA, & Broughton BC (1975) The influence of caffeine on cell survival in excision-proficient and excision-deficient xeroderma pigmentosum and normal human cell strains following ultraviolet-light irradiation. *Mutat Res* 33(2-3):341-346.
28. de Feraudy S, Revet I, Bezrookove V, Feeney L, & Cleaver JE (2010) A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(15):6870-6875.
29. Cleaver JE (2011) γ H2Ax: biomarker of damage or functional participant in DNA repair "all that glitters is not gold!". *Photochem Photobiol* 87(6):1230-1239.
30. Olive PL & Banáth JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1(1):23-29.
31. Callegari AJ, Clark E, Pneuman A, & Kelly TJ (2010) Postreplication gaps at UV lesions are signals for checkpoint activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(18):8219-8224.
32. Jansen JG, et al. (2009) Separate domains of Rev1 mediate two modes of DNA damage bypass in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 29(11):3113-3123.
33. Wang J, Gong Z, & Chen J (2011) MDC1 collaborates with TopBP1 in DNA replication checkpoint control. *J Cell Biol* 193(2):267-273.
34. Cimprich KA & Cortez D (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(8):616-627.
35. Halicka H, et al. (2005) Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cell Cycle* 4(2):339-345.
36. Moraes MC, et al. (2012) Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Lett* 314(1):108-118.
37. Saffi J, et al. (2010) Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)* 9(1):40-47.
38. Pelegri AL, et al. (2010) Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis* 25(5):447-454.

Figures and Figure Legends

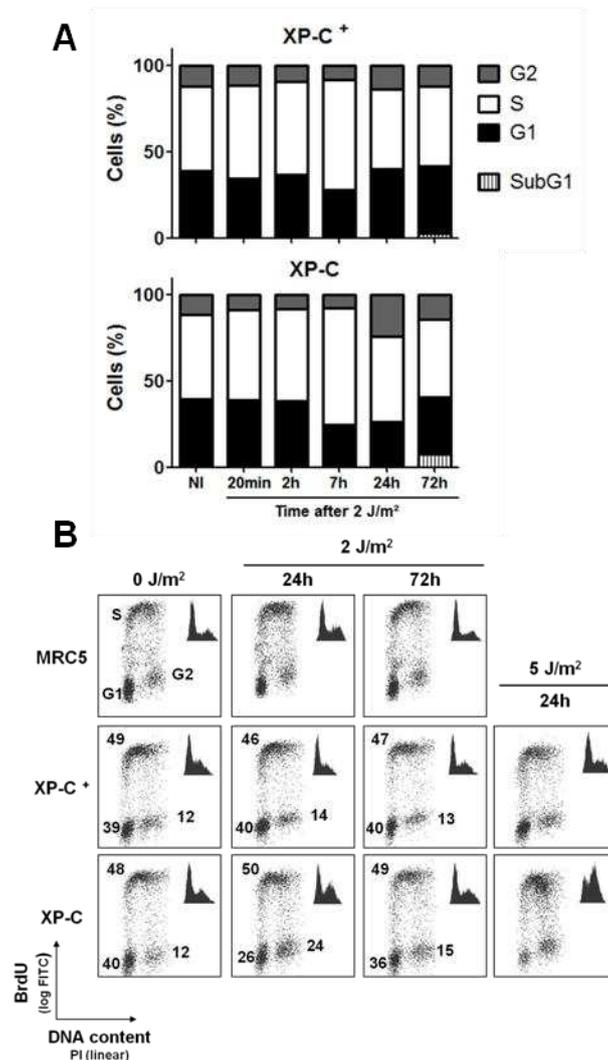


Figure 1. XP-C cells are temporarily arrested in the G2 phase of the cell cycle after a low UVC dose. The cell cycle phase of wild-type and XP-C cells was evaluated by BrdU and propidium iodide (PI) staining and was detected by flow cytometry after a 2 J/m² UVC dose. Briefly, S phase cells are BrdU positive, and PI, a DNA intercalating agent, indicates that G2 cells contain two-fold more DNA than G1 cells. (A) Quantification of the flow cytometry data showing the percentage of cells in each cell cycle phase at the indicated times after a 2 J/m² UVC dose. The sub-G1 fractions measured 72 hours after a 2 J/m² UVC dose are indicated. At least two independent flow cytometry experiments were performed in duplicate. (B) Representative graphics are shown and the average percentages of cells in the G1, S and G2 phases obtained via three independent experiments are indicated. At the top right, the corresponding cell cycle distributions determined by PI staining are shown.

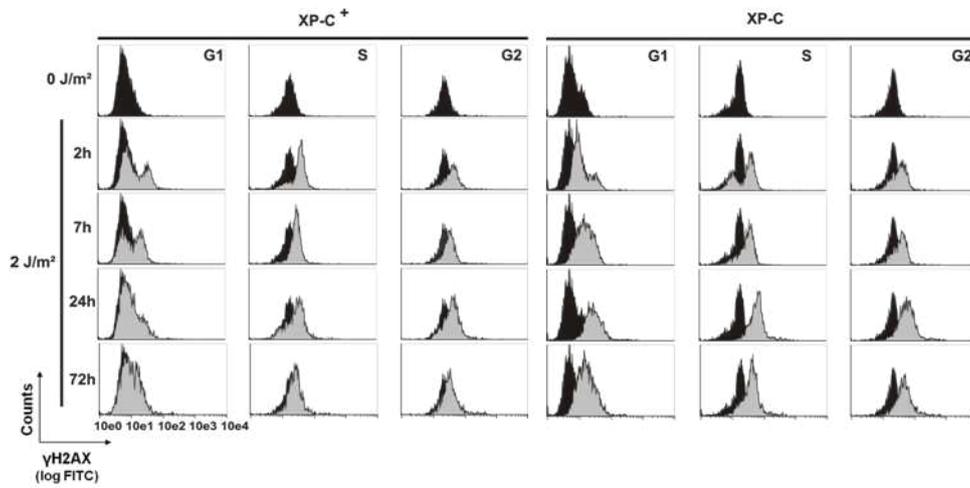


Figure 2. UVC induces γ H2AX formation in all cell cycle phases in XP-C cells. The data describe γ H2AX staining for each cell cycle phase. γ H2AX and DNA contents in XP-C⁺ and XP-C cells were measured by flow cytometry at the indicated times after either 0 (black histograms) or a 2 J/m² (gray histograms) doses of UVC.

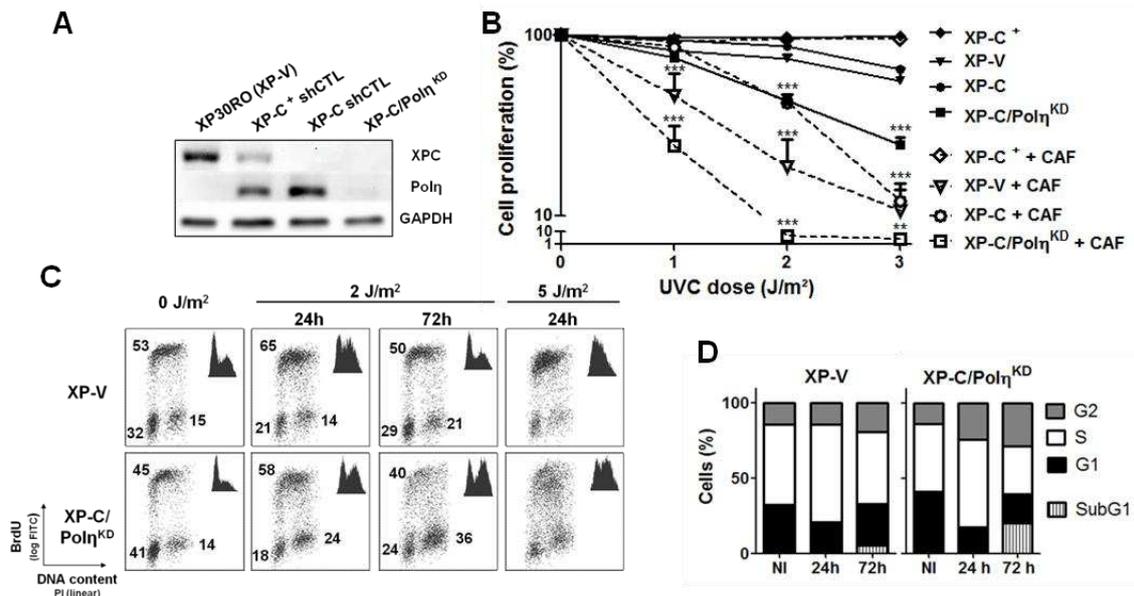


Figure 3. XP-C/Pol η^{KD} cells present both XP-C and XP-V phenotypes and are more sensitive to UVC irradiation than XP-C cells. (A) POLH was stably knocked down in XP-C human fibroblasts as assessed by western blotting. (B) The proliferation of XP-C⁺, XP-V, XP-C and XP-C/Pol η^{KD} cells was determined 72 hours after 0, 1, 2 and 3 J/m² doses of UVC with or without 1 mM caffeine (CAF). The significance of the difference between each cell line irradiated with a 2 J/m² UVC dose without CAF compared to when the cell line was treated with UVC + CAF is shown (**P < 0.001; ***P < 0.0001). (C) The cell cycle phases of XP-V and XP-C/Pol η^{KD} cells were evaluated by BrdU and PI staining as detected by flow cytometry at the indicated times after UVC treatment. Representative graphics are shown, and the averages of the percentages of cells in the G1, S and G2 phases from three independent experiments are indicated. At the top right, the cell cycle distribution determined by PI staining is shown. (D) Averages of the percentages of cells in each cell cycle phase from three independent flow cytometry experiments. The sub-G1 fractions measured 72 hours after UVC treatment are indicated.

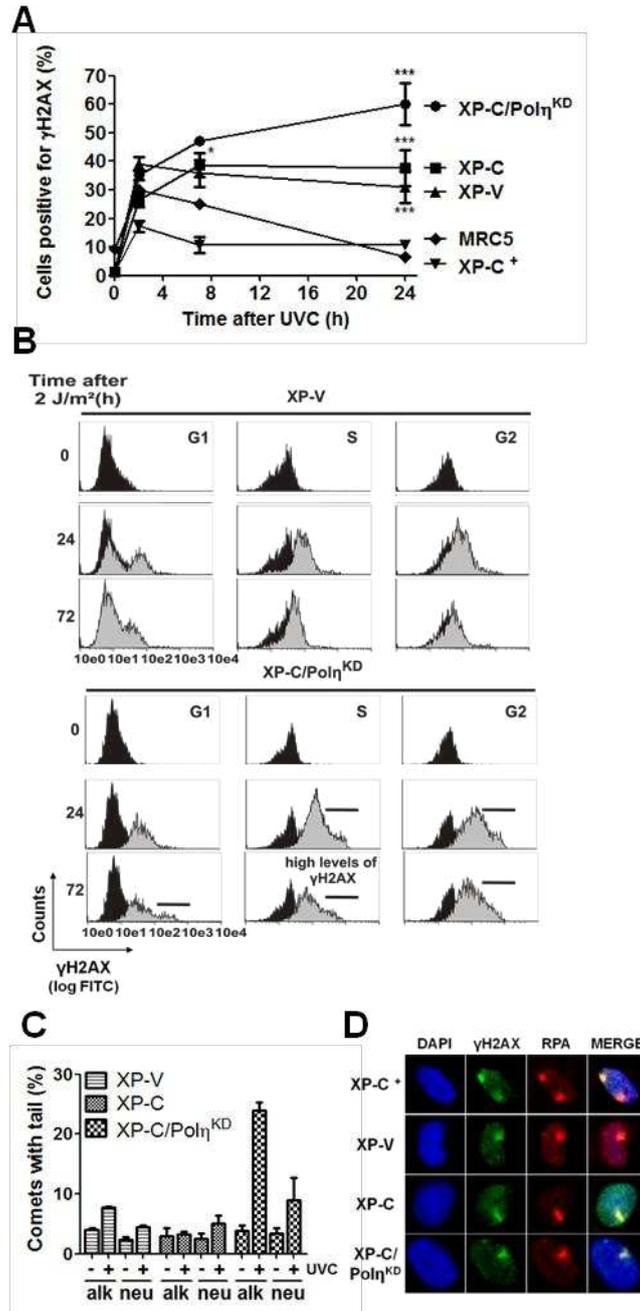


Figure 4. XP-C/Polη^{KD} cells present pronounced levels of γH2AX colocalization with RPA and induction of single and double DNA strand breaks after a 2 J/m² UVC dose. (A) γH2AX immunostaining was detected by flow cytometry at the indicated times after a 2 J/m² UVC dose. The cells showing a more intense γH2AX signal than untreated cells were considered positive. Data are shown as the mean (± s.e.m.) of three independent experiments. The significance of the differences between the XP-C/Polη^{KD} cells versus the XP-C cells and the XP-C and XP-V cells versus MRC5 cells is shown (*P < 0.05; ***P < 0.0001). (B) Histograms show the representative γH2AX staining from three individual experiments on each phase of the cell cycle at the indicated times after a 2 J/m² UVC dose. The lines indicate high levels of γH2AX. (C) DNA breaks and double strand breaks were detected 24 h after UVC treatment using the alkaline and neutral comet assays, respectively. Data are presented as the percentages of comets with tails (± s.e.m.) under alkaline (alk) or neutral (neu) conditions and are averages from at least two experiments performed in triplicate; 100 comets per sample were scored. (D) Cells

were exposed to a 150 J/m² UVC dose through 5 μm-diameter isopore filters and were immunostained for γH2AX and RPA p34 7 h later.

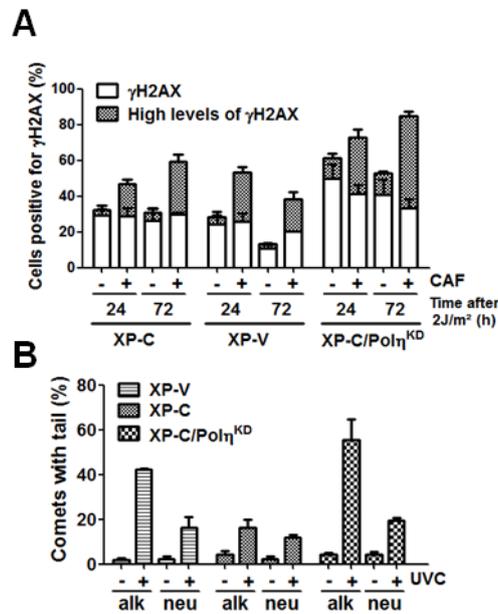


Figure 5. Caffeine induces high levels of γH2AX and DNA strand breaks in the XPC- and Polη-deficient fibroblasts exposed to a low UVC dose. Cells were treated with a 2 J/m² UVC dose in the presence of 1 mM of caffeine (CAF). (A) Percentages of cells positive for γH2AX staining and specifically cells presenting high levels of γH2AX were quantified via flow cytometry. The gates for high levels of γH2AX were defined from the 24 h after 2 J/m² UVC time point staining. (B) DNA strand-break induction was measured 24 hours after 2 J/m² UVC irradiation in the presence of caffeine by the alkaline (alk) and neutral (neu) comet assays and was quantified by counting comets with tails. Histograms represent the mean (± s.e.m.) of at least two independent experiments performed in triplicate; 100 comets per sample were scored.

Supporting Information

Quinet et al., 2012

SI Figure legends

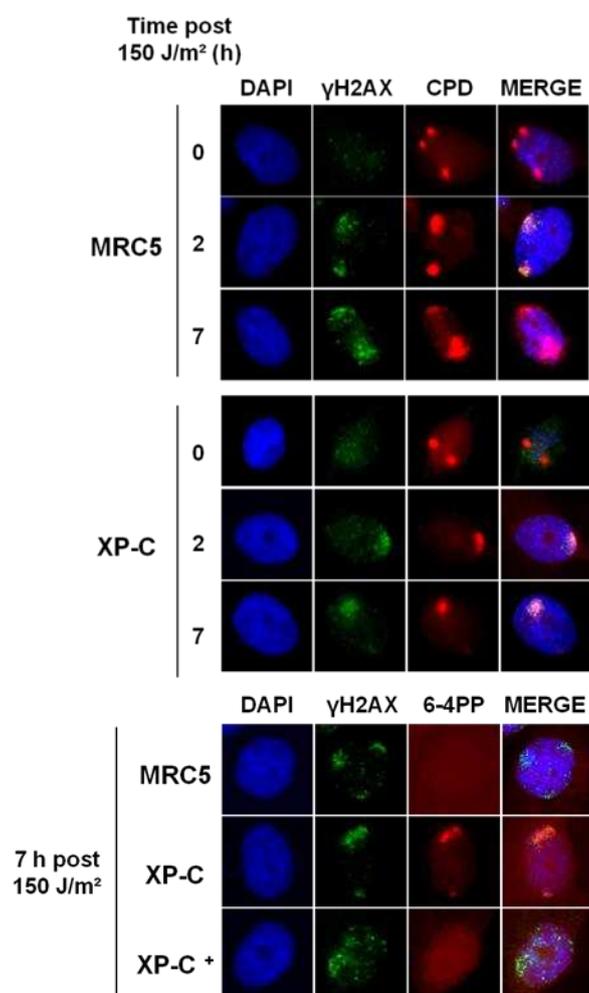


Figure S1. Histone H2AX is phosphorylated as a consequence of photoproducts persistence. XP-C, XP-C⁺ and MRC5 fibroblasts were exposed to 150 J/m² UVC through 5 μ m-diameter isopore filters and immunostained for γ H2AX and CPD (Top) or 6-4PP (Bottom) at the indicated times. Antibodies used: mouse anti-CPD and anti-6-4PP (Cosmo Bio Co., Ltd, Tokyo, Japan).

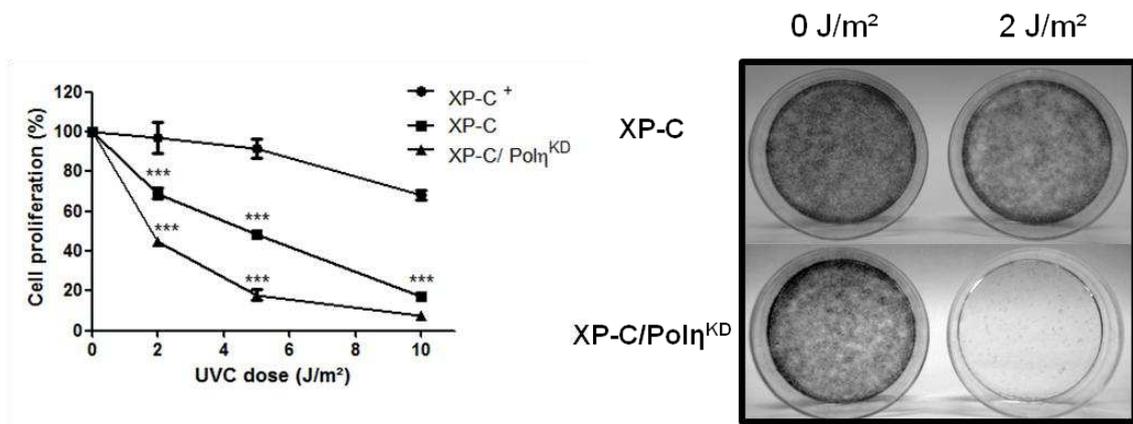


Figure S2. (Left) XP-C⁺, XP-C and XP-C/Polη^{KD} fibroblasts were exposed to 2, 5 and 10 J/m² UVC and counted 72 hours later. P values were calculated by comparing XP-C versus XP-C⁺ cells and XP-C/Polη^{KD} versus XP-C. (Right) XP-C (on the top) and XP-C/Polη^{KD} (on the bottom) cells 6 days after 0 (left) and 2 (right) J/m² UVC. 2.10⁴ cells were plated in 60 mm plates and fixed and colored with violet crystal 6 days after treatment.

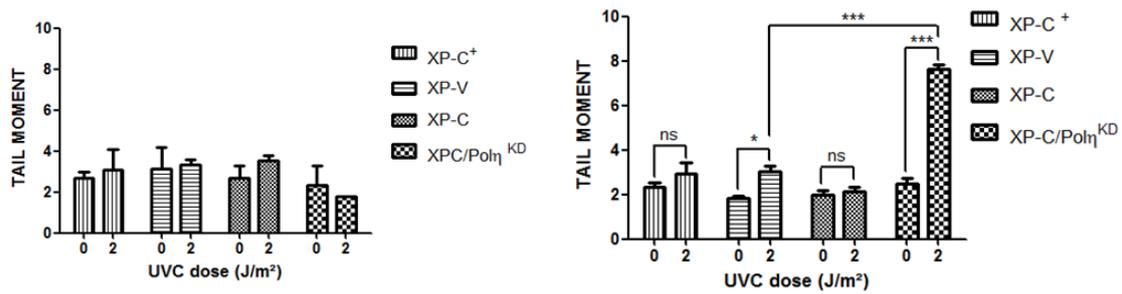


Figure S3. Alkaline comet assay performed immediately (left) or 24 hours (right) after 2 J/m² UVC irradiation. Histograms represent the comet tail moments mean (\pm s.e.m.) of at least two independent experiments done in triplicate. Statistical analyses were applied by comparing treated versus untreated cells with unpaired Student t test and between cell lines with two-way ANOVA followed by Bonferroni test. ns, non significant; *P < 0.05; ***P < 0.0001.

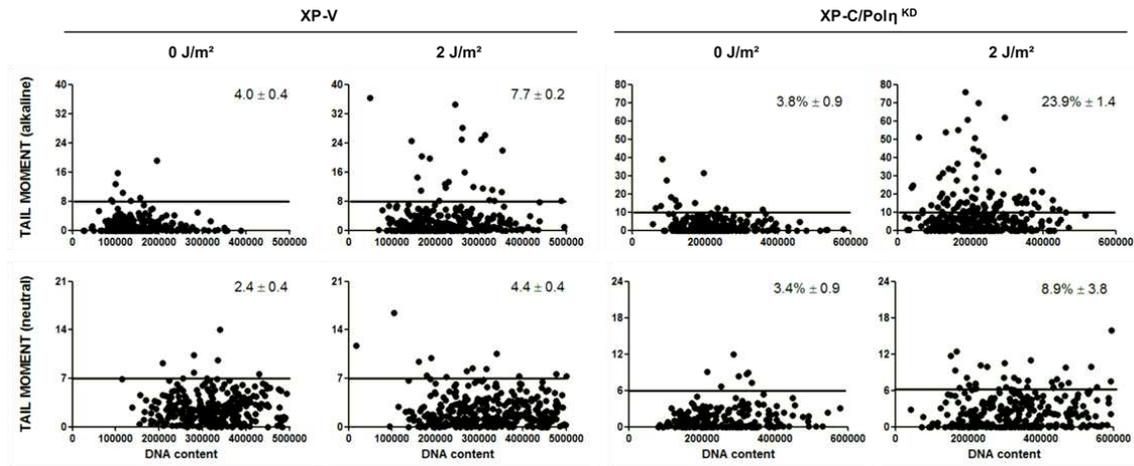


Figure S4. DNA strand breaks and DSB were detected 24 h after UVC by alkaline and neutral comet assay, respectively. Data represent individual comets plotted in function of their tail moment and DNA content. Based on unirradiated cells' graphs, we defined a gate above which comets would be considered positive for tail. The percentages of comets with tail (\pm s.e.m.) are shown on the top right of each plot. Alkaline and neutral comet assay were done at least twice in triplicate.

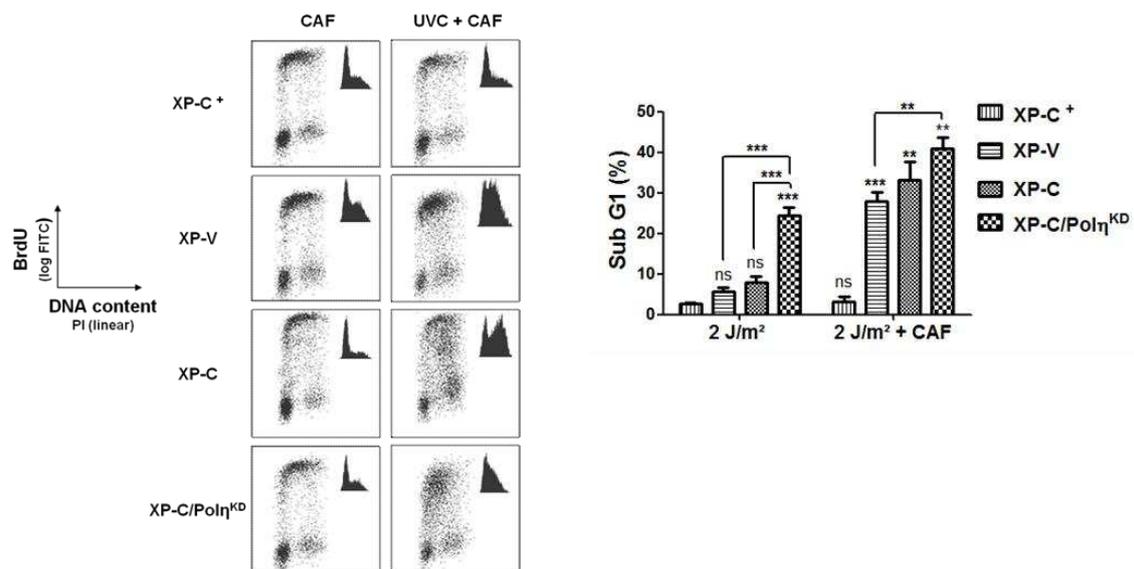


Figure S5. Caffeine sensitizes all XPC- and Polη-deficient cell lines to UVC exposure. Cells were irradiated with 2 J/m² UVC in the presence of 1 mM of caffeine (CAF). (Left) Cell cycle progression was assessed 24h after treatment by co-staining cells with anti-BrdU and propidium iodide (PI) followed by analysis in a flow cytometry. At the top right, the correspondent cell cycle distribution determined only by PI staining is shown. Flow cytometry analyses were done at least three times independently in duplicate and representative graphics are shown. (Right) The sub-G1 fraction was detected by flow cytometry 72 hours after the exposure. Each value represents the mean (\pm s.e.m.) of at least three independent experiments. The significance of the differences between each irradiated cell line versus irradiated XP-C⁺ cells, between indicated treated cell lines and between each cell line treated with UVC + caffeine versus only irradiated cells are shown (ns, non significant, **P < 0.001; ***P < 0.0001)

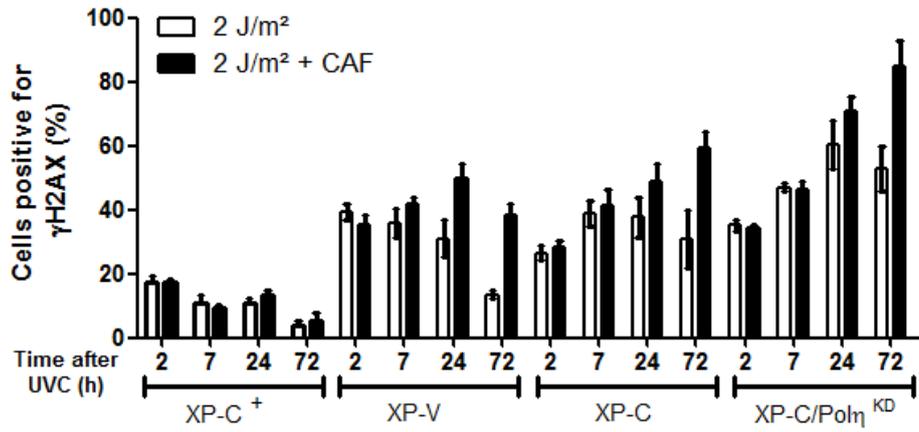


Figure S6. Fibroblasts were exposed to 2 J/m² UVC ± caffeine (CAF) and γ H2AX immunostaining was detected by FACS at the indicated times. Unirradiated cells' γ H2AX staining was considered negative and cells presenting a stronger γ H2AX signal were considered positives. Data correspond to the mean (\pm s.e.m.) of at least two independent experiments.

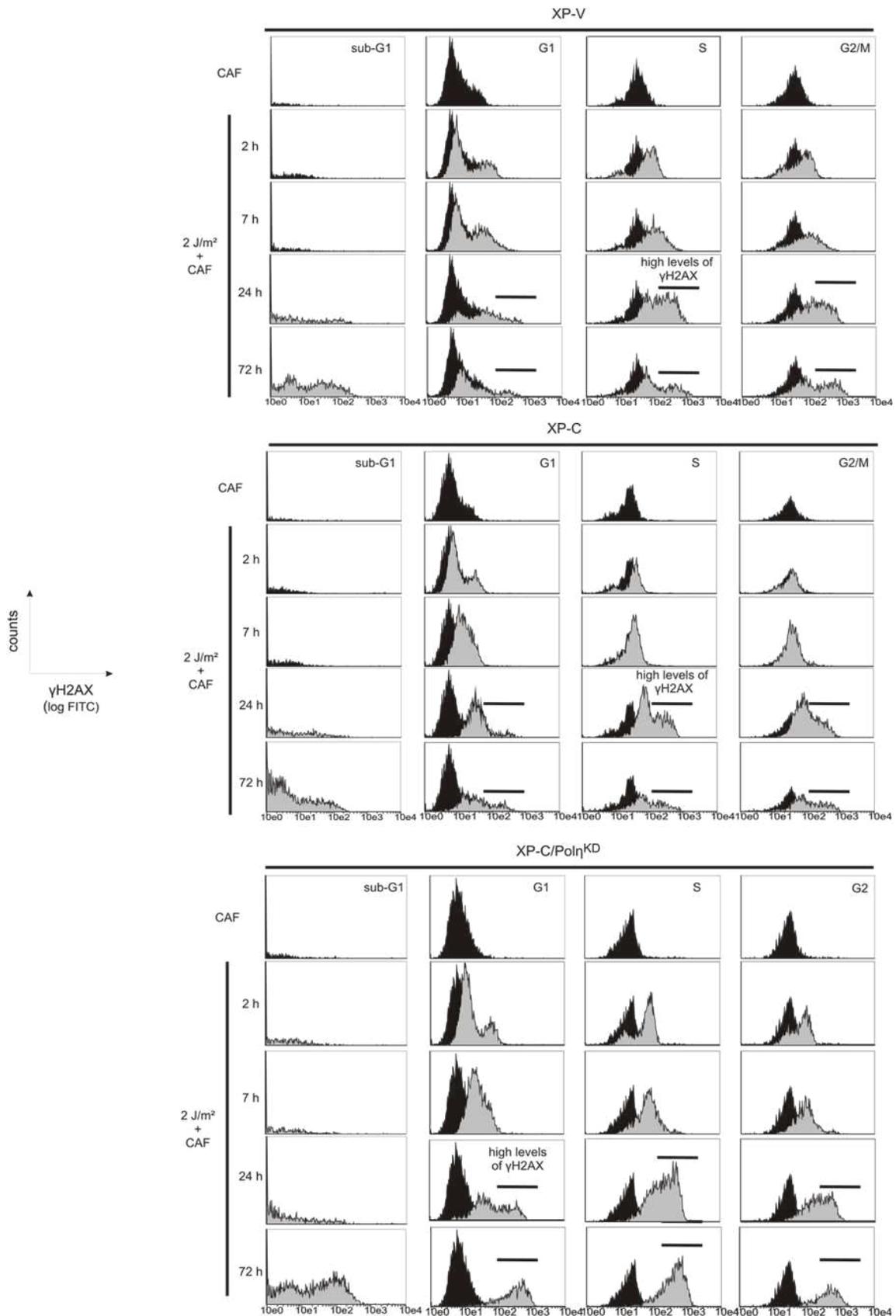


Figure S7. Fibroblasts were exposed to 2 J/m² UVC and caffeine (CAF) and stained for γ H2AX and DNA content at the indicated times. Data represent γ H2AX staining for each phase of cell cycle and lines indicate high levels of γ H2AX.

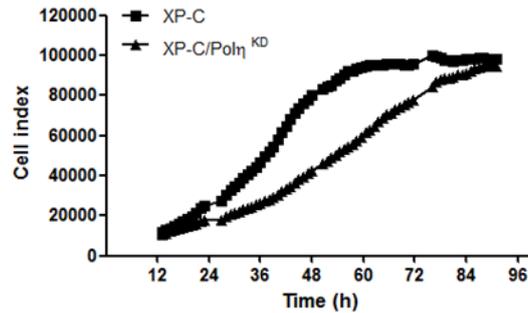


Figure S8. XP-C and XP-C/Pol η ^{KD} cells' proliferation followed up to 96 hours in routinely growing conditions.

SI Material and Methods

Gene silencing with pEBV vectors

To stably knockdown the expression of the gene coding for the DNA polymerase η in XP-C human fibroblasts, Epstein-Barr-derived vectors (pEBV) carrying a short hairpin RNA (shRNA) and a hygromycin resistance gene were used. pEBV vectors are episomal and replicative and consequently impose long-term, stable silencing with few chances of secondary effects in human cells (1). The shRNA design and the cloning of the pEBV vectors were previously described (1-3). The pEBV vectors were transfected into XP-C cells with Fugene HD (Promega, Madison, WI, USA), and knocked-down (KD) populations and clones were selected and maintained in culture with 125 μ g/mL of Hygromycin B (Invitrogen, Life Technologies). We selected the clone that was most efficiently silenced and designated it XP-C/Pol η ^{KD}. XP-C/Pol η ^{KD} cells were cultivated for more than 150 days, and gene silencing was regularly checked using western blotting. As controls, we used XP-C and XP-C⁺ cells that were stably transfected with a pEBV carrying an impaired shRNA sequence (shCTL) (1). All of the experiments with XP-C/Pol η ^{KD} cells were performed with XP-C shCTL and XP-C⁺ shCTL cells as controls. XP-C/Pol η ^{KD} cells were found to proliferate less rapidly than their XP-C isogenic counterparts (Fig. S8), which is in agreement with previously reported data in U2OS cells that showed a Pol η KD using the same pEBV-shRNA (3).

Cell proliferation

To determine cell proliferation in the absence of any treatment, we performed a real-time assay with the xCELLigence system (Roche) according to the manufacturer's instructions and as previously described (4). Briefly, XP-C and XP-C/Pol η ^{KD} fibroblasts were seeded at 3,500 cells per well in an E-Plate (Roche), a 96-well plate containing microelectrodes. Upon plating, each well's impedance was measured every hour for 96 h. Using the impedance values, the software determines a cell index that correlates with the number of cells attached per well.

Flow cytometry (sub-G1, cell cycle and γ H2AX analyses)

Cell cycle, sub-G1 and γ H2AX analyses were performed by adapting the flow cytometry protocol previously described (4, 5). Approximately 1.5×10^5 cells per 60 mm plate were seeded prior to treatment. After the indicated recovery periods, the detached dying cells and trypsinized adherent cells were fixed with 1% formaldehyde in ice, washed with PBS, resuspended in 70% ice-cold ethanol and stored for at least 24 hours at -20°C . After blocking and permeabilizing with BSA-T buffer (0.2% Triton X-100, Sigma-Aldrich; 1% bovine serum albumin in PBS, BSA, Sigma-Aldrich), samples were incubated with an anti- γ H2AX antibody (Millipore, Billerica, MA, USA) at a 1/500 dilution overnight at 4°C . Samples were then washed twice with BSA-T buffer and incubated with an anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC) antibody (Sigma-Aldrich) at a 1/200 dilution for 1 hour at room temperature (RT) in the dark. After two washings, the DNA was stained with $20 \mu\text{g/mL}$ of propidium iodide (PI) with $200 \mu\text{g/mL}$ of RNase A (Invitrogen) and 0.1% Triton X-100 in filtered PBS for 40 minutes at RT. We defined a gate for the γ H2AX-positive cells based on the unirradiated cells that were negative for this staining.

For cell cycle analysis, cells were treated, allowed to recover for the indicated times and labeled with $10 \mu\text{M}$ of BrdU (Bromodeoxyuridine, Sigma-Aldrich) for 20 minutes prior to harvesting. The cells were then detached, washed twice with PBS, fixed with 75% chilled ethanol and stored at -20°C . The day before image acquisition, DNA was denatured with $14 \mu\text{M}$ pepsin (1.5% 2 M HCl in water, 250 U/mg, Sigma-Aldrich) for 20 minutes at 37°C and subsequently with 2 M HCl for 20 minutes at RT. Cells were then washed with PBS, blocked, permeabilized with Bu buffer (0.5% FBS, 0.5% Tween-20 and 20 mM HEPES in PBS) and incubated with a 1/100 dilution of an anti-BrdU antibody (mouse, Invitrogen) for 45 minutes. The samples were then washed and incubated for 30 minutes in the dark in a 1/200 dilution of anti-mouse FITC (Sigma-Aldrich). Finally, DNA was stained with PI as described above. We defined the gates for the G1, S and G2 phases based on BrdU and DNA content staining; G1 and G2 cells are BrdU negative, while S phase cells are BrdU positive. The G2 cells have twice the DNA content that G1 cells have.

Samples were applied to a Guava Flow Cytometer, and the data were analyzed with CytoSoft Data Acquisition and Analysis Software (Millipore). For the sub-G1 and γ H2AX analyses, 10,000 cells were counted for each sample and 5,000 cells were acquired to determine cell cycle.

Western Blot

Cells were trypsinized, centrifuged for 1 minute at 10,000 rpm and 4°C , washed with cold PBS and pelleted. For protein extraction, pellets were resuspended in lysis buffer (LB) [50 mM Tris pH 7.5, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail (Cocktail Set III, Calbiochem, Merck, White House Station, NJ, USA)] with benzonase (Novagen, Merck) added to a final concentration of $0.25 \text{ U}/\mu\text{L}$ and lysed for 20 minutes on ice under agitation.

Samples were then centrifuged for 10 minutes at 13,000 rpm and 4°C, and the supernatants containing the proteins were reserved. Aliquots of protein were subjected to Bradford quantification (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were denatured with 4X Laemmli Buffer (187.5 mM Tris-HCl, 125 mM DTT, 6% SDS, 30% glycerol and 0.03% bromophenol blue) for 10 minutes at 90°C. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to separate 20 µg of protein for each sample. After the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) and blocked, membranes were blotted with the following antibodies: rabbit anti-Pol eta (ab-17725Abcam), mouse anti-XPC (ab-6264Abcam) and mouse anti-GAPDH (sc-32233 Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA). The mouse and rabbit HRP-conjugated antibodies were purchased from Sigma-Aldrich.

Alkaline and neutral comet assays

To detect DNA breaks, either immediately or 24 h after treatment, 10^5 cells, seeded in 35 mm plates, were trypsinized and resuspended in 180 µL of 0.5% low melting point (LMP) agarose at 37°C. Cells were then homogeneously spread onto two microscope slides precoated with 1.5% agarose and were immediately covered with coverslips. To solidify the LMP agarose, the slides were kept at 4 °C for 10 minutes. After carefully removing the coverslips, the cells were lysed overnight in chilled lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris and freshly added 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) pH 10) at 4°C. The slides were then placed horizontally in an electrophoresis chamber with cold alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13) for 25 minutes, and electrophoresis was performed for 25 minutes at 25 V and 300 mA. For the neutral comet assay, after an overnight lysis, the slides were washed three times with chilled neutral electrophoresis buffer (300 mM sodium acetate, 100 mM Tris, acetic acid, pH 8.5) and equilibrated for 1 hour horizontally in this cold buffer before being subjected to electrophoresis for 1 hour at 14 V and 12 mA. Subsequently, slides were neutralized with three 5-minute washes with neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) and fixed with ice-cold 100% ethanol. Finally, the slides were stained with ethidium bromide and imaged with a fluorescence microscope (Axiovert 200, Zeiss) at a magnification of 400x. At least 100 comets per slide were scored with the Comet Assay IV software (Perceptive Instruments).

SI references

1. **Biard DS (2007) Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res* 35(11):3535-3550.**
2. **Bétous R, et al. (2009) Role of TLS DNA polymerases eta and kappa in processing naturally occurring structured DNA in human cells. *Mol Carcinog* 48(4):369-378.**

3. **Rey L, et al. (2009) Human DNA polymerase eta is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication. Mol Cell Biol 29(12):3344-3354.**
4. **Moraes MC, et al. (2012) Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. Cancer Lett 314(1):108-118.**
5. **Huang X & Darzynkiewicz Z (2006) Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. Methods Mol Biol 314:73-80.**



Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions

Maria Carolina S. Moraes^a, Annabel Quinet de Andrade^{a,b}, Helotonio Carvalho^c, Temenouga Guecheva^d, Mateus H. Agnoletto^d, João A.P. Henriques^d, Alain Sarasin^b, Anne Stary^b, Jenifer Saffi^{d,e}, Carlos F.M. Menck^{a,*}

^a Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

^b Centre National de la Recherche Scientifique UMR8200, Institut Gustave Roussy, University Paris-Sud, Villejuif, France

^c Department of Biological Sciences, Federal University of São Paulo (UNIFESP), Diadema, SP, Brazil

^d Department of Biophysics, Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^e Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2011

Received in revised form 31 August 2011

Accepted 18 September 2011

Keywords:

Doxorubicin

DNA polymerase eta (pol eta)

XPV

XPA

LY294002

DNA repair

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) is an important tumor chemotherapeutic agent, acting mainly by genotoxic action. This work focus on cell processes that help cell survival, after DOX-induced DNA damage. In fact, cells deficient for XPA or DNA polymerase eta (pol eta, XPV) proteins (involved in distinct DNA repair pathways) are highly DOX-sensitive. Moreover, LY294002, an inhibitor of PI3K kinases, showed a synergistic killing effect in cells deficient in these proteins, with a strong induction of G2/M cell cycle arrest. Taken together, these results indicate that XPA and pol eta proteins participate in cell resistance to DOX-treatment, and kinase inhibitors can selectively enhance its killing effects, probably reducing the cell ability to recover from breaks induced in DNA.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past 40 years or more, Doxorubicin (DOX) (tradename, Adriamycin[®]), an anthracycline antibiotic, has been widely used in the chemotherapeutic treatment of a broad range of malignancies, from solid tumors, as those in the breast, liver and bile ducts, to haematological diseases, such as non-Hodgkin's lymphoma. Nevertheless, despite its extensive clinical use, DOX mechanisms of action are, as yet, not fully understood. The most well characterized mechanism is through the inhibition of the enzyme topoisomerase-II (topo-II), with the subsequent formation

of double-strand breaks (DSBs) in DNA. However, several other mechanisms are also thought to play a role in DOX induced cytotoxicity, such as DNA adduct formation, DNA cross-linking and free radical formation. Furthermore, DOX-genotoxicity is also affected by both drug concentration and cell type specificity [1]. Apart from the uncertainty regarding DOX-induced DNA lesions, the mechanisms involved in their repair are also poorly understood. Deducing how these lesions are repaired is a current challenge that, if successful, could lead to more favorable clinical outcomes for patients undergoing DOX-treatment.

It has been shown that the kinase DNA-PKcs, a component of the Non-Homologous End Joining (NHEJ) pathway, participates in the repair of DOX-induced DNA lesions, most likely by repairing the DSBs induced by the inhibition of topo-II [2]. Another pathway that seems to be relevant in their repair is Nucleotide Excision Repair (NER), one of the

* Corresponding author. Address: Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Edifício Biomédicas 2, Anexo Didático, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 3091 7499; fax: +55 11 3091 7354.

E-mail address: cfmmenck@usp.br (C.F.M. Menck).

most versatile repair pathways in mammalian cells. In NER, there are two subpathways that differ only in the recognition of DNA damage, viz., transcription coupled repair (TCR), which is selective for lesions in the transcribed strand of expressed genes, and global genome repair (GGR), that acts throughout the entire genome. After DNA damage recognition (in GGR by the proteins XPC-hHR23B and DDB1/DDB2), the helicases XPB and XPD sequentially open the double helix, and the endonucleases XPG and ERCC1-XPF cleave the damaged strand a few bases away from the lesion. The proteins XPA and RPA are also important for the efficacy of this repair process, which is followed by the removal of the DNA segment containing the lesion, and the subsequent resynthesis of this strand, using the intact one as template. Defects in the NER proteins XPA–XPG give rise to the inherited disease xeroderma pigmentosum (XP) [3,4]. When NER is not impaired, a variant form of this disease (XPV) can also be caused by defects in post replication repair machinery, or more specifically, defects in the protein DNA polymerase eta (pol eta) involved in translesion synthesis of DNA (TLS) [5]. Cells derived from XP patients and defective in the proteins XPA, XPC [6] and XPD [7] are more sensitive to the treatment with DOX, suggesting a role for these proteins in the repair of DOX-induced lesions.

In order to better understand the involvement of XP proteins in the repair of DOX-induced lesions, human cells defective in the proteins XPA, XPF or pol eta (XPV) were treated with clinical doses of DOX [1], whereupon their responses to the drug were analyzed. As shown here, cells defective in XPA (XP12BE) or pol eta (XP30RO) are much

more sensitive to DOX than cells either deficient in XPF (XP51RO) or proficient in DNA repair (MRC5). Cell response was also evaluated after treatment with both DOX and LY294002, an inhibitor of PIKKs, such as DNA-PKcs [8,9]. It was noted that LY294002 potentiates the cytotoxic effect of DOX only in the repair-deficient cells XP12BE and XP30RO, but not in the wild type MRC5. Moreover, in all the cells used in this study, DOX treatment induced a G2/M arrest in the cell cycle, also enhanced by LY294002.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture conditions

The cells used were: SV40-transformed human fibroblasts derived from skin biopsies of XP patients of complementation groups A (XPA–XP12BE and XP12RO cells) and V (XPV–XP30RO cells); SV40 transformed human fibroblasts derived from lung tissue of a normal fetus (MRC5 cells); hTERT transformed human fibroblasts derived from skin biopsies of an XP patient of complementation group F (XPF–XP51RO), and those from a normal individual (C5RO). XP51RO and C5RO were kindly provided by Dr. N. Jaspers (Erasmus University, Netherlands). MRC5 and C5RO cells with normal levels of DNA repair were used as controls. Cells were routinely grown at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in the appropriate medium: MRC5, XP12RO and XP12BE in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM–Invitrogen, Life Technologies, California, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS – Cultilab,

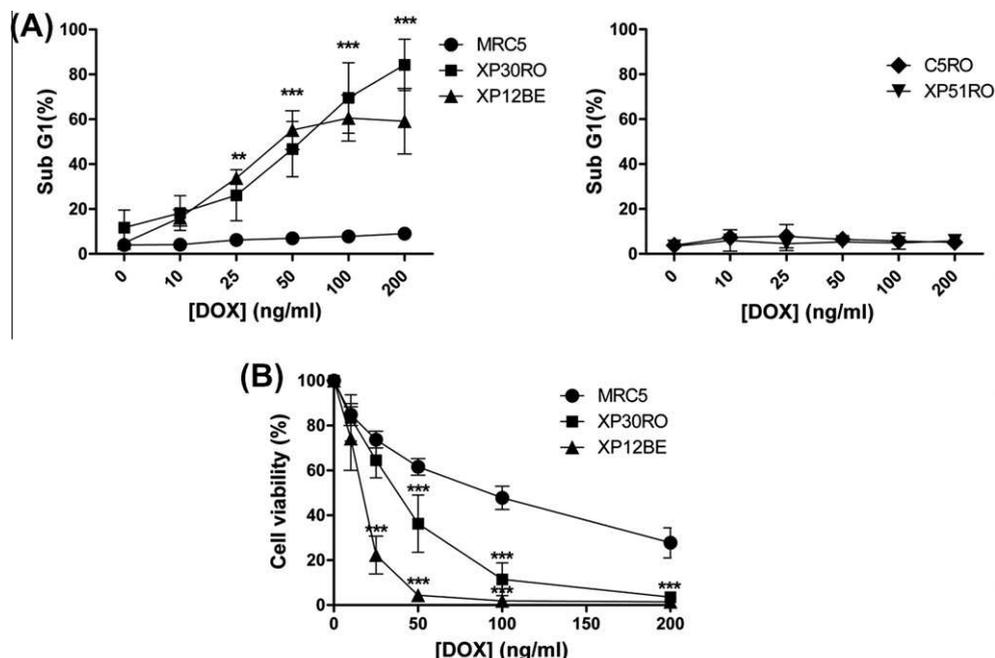


Fig. 1. DNA repair deficient and proficient cell sensitivity to DOX. Cells were exposed to the indicated doses of DOX for 48 h, whereupon either the sub-G1 fraction was detected by flow cytometry (A), or cell viability assessed by XTT assay (B). The cell lines used in these experiments were, as indicated: MRC5, C5RO, XP12BE (XPA), XP30RO (XPV) and XP51RO (XPF). Statistical analysis was applied for comparing DNA repair proficient (MRC5 and C5RO) with DNA repair deficient (XP12BE, XP30RO and XP51RO) cells. ** Significantly different $P < 0.01$ for XP12BE versus MRC5, and $P < 0.05$ for XP30RO versus MRC5; *** $P < 0.001$.

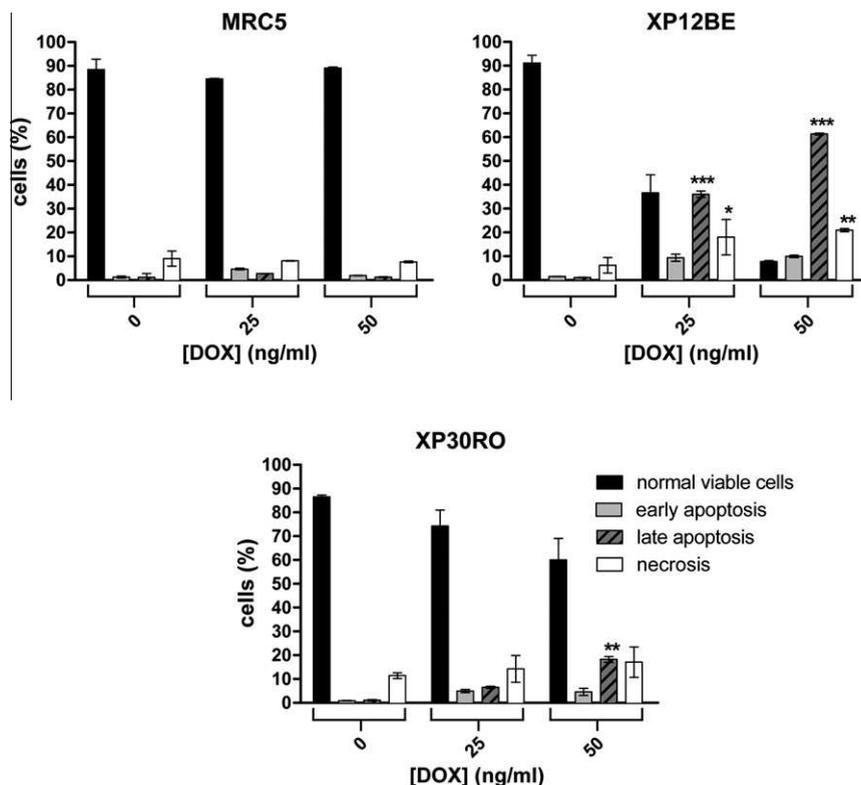


Fig. 2. DOX-induced cell death. Cells were exposed to the indicated doses of DOX for 48 h, and then analyzed with a combination of fluorescent dyes. A combination of fluorescein di-acetate (FDA), propidium iodide (PI) and Hoechst (HO) dyes was used to distinguish viable cells from those in necrosis, or early or late apoptosis. Cells were counted, and the percentages plotted on a graph. The cell lines used were: MRC5, XP12BE (XPA) and XP30RO (XPV). Statistical analysis, by cell line, was applied for comparing DOX-treated cells with non-treated. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Campinas, SP, Brazil); XP30RO in Eagle Minimum essential medium (MEM – Invitrogen, Life Technologies), supplemented with 10% FBS; and XP51RO and C5RO in HAM's medium (Invitrogen, Life Technologies), supplemented with 15% FBS.

2.2. Treatment conditions

For cytotoxicity assays, cells, in the appropriate medium, were first seeded onto 6-well plates at a concentration of 6×10^4 cells per well, and then grown for 24 h prior to treatment. The cultures were treated, in the dark, with different concentrations of DOX (up to 200 ng/mL) for 24, 48 or 72 h, as indicated. As control, cells were incubated with 0.25% ethanol for the same period of time. For co-treatments with DOX and LY294002 (modified from [8,9]), cells were incubated with 10 μ M LY294002, 1 h prior to addition of DOX to the culture medium. As control, cells were incubated with 0.1% DMSO.

2.3. Cell viability

After each treatment, cell viability was assessed with a Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche, Basel, Switzerland), according to manufacturer's instructions. Briefly, after discarding the medium, 1 mL of XTT labeling mixture was added to the cells and incubated for approximately 2 h at

37 °C. Absorbance was measured at 492 nm (A_{492}) and 750 nm (A_{750}), the final result corresponding to $A_{492}-A_{750}$.

2.4. Flow cytometry analysis (sub-G1 assay, cell cycle and γ H2AX analysis)

After treatment, adherent cells were trypsinized and mixed with detached dying cells, washed with PBS and then fixed with chilled 70% ethanol for at least 24 h at -20 °C. Staining was performed at room temperature for 30 min in filtered PBS containing 20 μ g/mL propidium iodide (PI), 200 μ g/mL RNase A and 0.1% Triton X-100. Data were collected with a Guava Flow Cytometer (GE Healthcare, United Kingdom), and the percentage of sub-G1 population determined with CytoSoft Data Acquisition and Analysis Software (GE Healthcare). For cell cycle, the collected data was analyzed with "ModFit LT" Software (Verity Software House, Maine, USA). For γ H2AX immunostaining, cells were fixed with 1% formaldehyde and then 70% ethanol. After blocking and permeabilization (0.2% Triton X-100 in PBS and 1% BSA), cells were incubated with the antibody anti- γ H2AX (Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139), clone JBW301 from Upstate, Millipore) diluted 1:500 for 1 h at room temperature. Cells were then washed and incubated with a secondary antibody (anti-mouse FITC, from Sigma) at 1:200 for 1 h at room temperature in the dark. Before collecting data, cells were stained with PI solution, as described above.

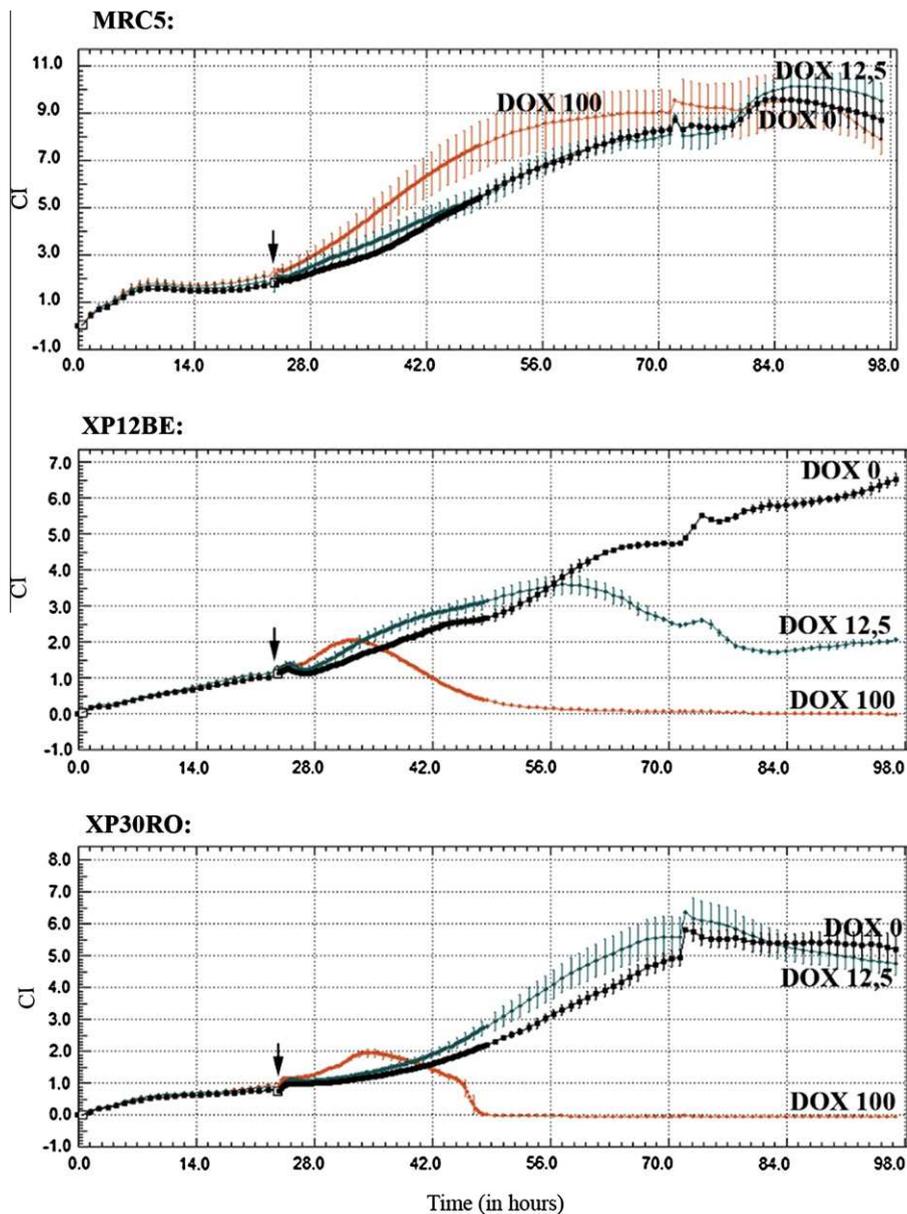


Fig. 3. Real time analysis of DOX-induced cytotoxicity. Histograms were obtained using the xCELLigence System. Cells were grown for 24 h before initiating DOX treatment (arrows), at the indicated doses (12.5 or 100 ng/mL; DOX 0 indicates the controls, incubated only with 0.25% ethanol). Cell index (CI) was recorded every hour, except for the first 48 h immediately after initiation of treatment, when recordings were every 15 min. The results are the means of at least three replicates, with displayed standard error bars.

2.5. Detection of apoptotic and necrotic cell death by fluorescence staining

Following treatment, adherent and detached cells were harvested by centrifugation, whereupon pellets were suspended in 20 μ L of chilled PBS. In order to distinguish apoptotic and necrotic cells from those viable, the cellular suspension was mixed with a combination of dyes, viz., 705 μ g/mL fluorescein di-acetate (FDA), 250 μ g/mL PI, and 100 μ g/mL Hoechst 33342 (HO). FDA and HO are vital dyes, which stain the cytoplasm and nucleus of viable cells, respectively. The necrotic and late stage of apoptotic cells are identified by PI staining. Whereas the characteristic

pattern of chromatin fragmentation was noted in cells in the early (viable-HO stained) and late (dead-PI stained) phases of apoptosis, the nucleus was non-fragmented in normal and necrotic cells [10]. At least 500 cells were randomly scored by microscopic analysis.

2.6. Real-time cellular cytotoxicity assay (xCELLigence)

Assaying was according to manufacturer's instructions and as previously described [11–14]. Briefly, cells were seeded onto a 96-well E-Plate (Roche), with interdigitated microelectrodes at the bottom of each well, at a concentration of 1.2×10^4 (MRC5), 3.1×10^3 (XP12BE) or

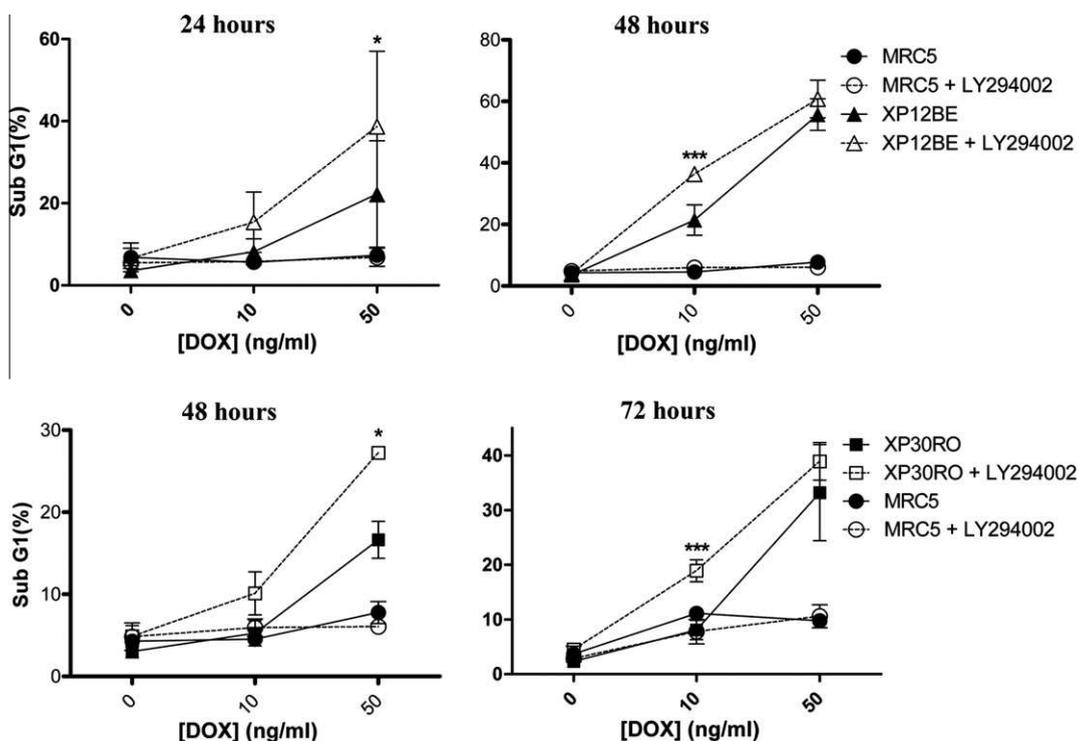


Fig. 4. LY294002 enhances the DOX cytotoxic effect. Cells were exposed to DOX (10 ng/mL and 50 ng/mL) and/or 10 μ M LY294002 (LY). The sub-G1 fraction was detected by flow cytometry, at the indicated times after treatment. The cell lines used in these experiments were, as indicated: MRC5, XP12BE (XPA) and XP30RO (XPV). Statistical analysis, by cell line, was applied for comparing cells treated only with DOX with those co-treated with both DOX and LY. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

6.2×10^3 (XP30RO) cells per well. After 30 min at room temperature, the E-Plate was placed onto an xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) SP System device (Roche), located inside a tissue culture incubator, where cells were left to grow for 24 h before being exposed to 0.25% ethanol or various doses of DOX (from 6.25 ng/mL to 200 ng/mL). Impedance was continuously measured over the following 72 h. The increase in the number and size of cells attached to the electrode sensors leads to increased impedance, from which derive the cell index values displayed at the plot. Hence, the cell index correlates with the number of cells attached to the bottom of the well.

2.7. Statistical analysis

Results represent the mean of two or three independent experiments, each done in triplicate, with error bars showing the standard error. Experimental differences were tested for significance using Two-way ANOVA analysis, followed by Bonferroni post-testing (Prism 5 – GraphPad Software Inc., California, USA).

3. Results

3.1. DOX-induced cytotoxicity

In order to define DOX-induced cytotoxicity in cells proficient (MRC5 and C5RO) and deficient (XP12BE, XP30RO and XP51RO) in DNA repair, cell viability and cell death induced by this chemotherapeutic drug were determined. Cells deficient in XPA (XP12BE) or in pol eta (XP30RO) proved to be more sensitive to 48-h treatments with clinical doses of

DOX than those deficient in XPF (XP51RO) or the wild type (Fig. 1). Besides dying more from apoptosis, as inferred from increased percentages of fragmented DNA (sub-G1 fraction) (Fig. 1A), XP12BE and XP30RO cells are also less viable than MRC5 (Fig. 1B). XP12RO, another XPA-deficient cell line with similar higher sensitivity to DOX (data not shown; and [6]), was used for corroborating the results with XP12BE. Interestingly, XP51RO cells are not more sensitive to DOX, at least not with the doses used, as shown by sub-G1 levels (Fig. 1A). This absence of an observable phenotype could be attributed to residual NER activity retained in cells derived from XPF patients, which can sometimes reach 30% of normal NER levels [15]. Thus, it stands to reason that this residual activity could be responsible for the repair of DNA damage induced by the doses used herein. Moreover, as XPF, an endonuclease, is also involved in homologous recombination repair of mainly DNA interstrand crosslinks, the results indicated that either this repair pathway is not directly involved in the repair of DOX-induced DNA lesions, or other alternative endonucleases are. Interestingly, in these and the following experiments, XP-A cells showed to be more sensitive than XP-V cells. This may indicate that full deficiency of NER is more deleterious than the lack of pol eta, probably compensated by the repair of lesions by NER in XP-V cells.

To check whether DOX induces death by necrosis and confirm the increase in apoptosis observed earlier, treated and non-treated cells were stained with dyes that allow distinguishing normal viable cells, necrotic cells and cells in early or late apoptosis. As shown in Fig. 2, treatment with low doses of DOX for 48 h induced apoptosis in both XP12BE and XP30RO cells, but not in MRC5, thus confirming the results obtained by sub-G1 cellular fraction analysis (Fig. 1A). Although there was a slight increase in necrosis in XP12BE cells, this was not so in either XP30RO or MRC5 cells. Even though statistically significant, the occurrence was more likely due to experimental variation, since in another set of independent experiments no such increase was detected (Fig. 5).

In order to analyze DOX-induced cellular cytotoxicity in real time, thereby complementing the end-point assays already described, the xCELLigence RTCA SP System (Roche), which does not depend upon the incorporation of labels [11–14], was used. As can be seen in Fig. 3,

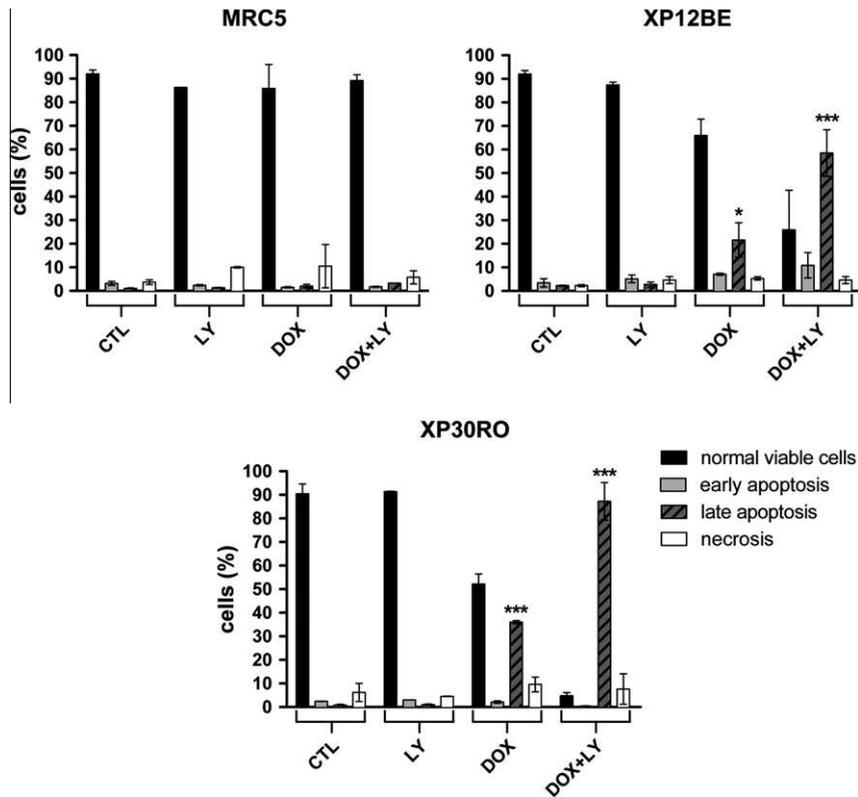


Fig. 5. Cell death induced by DOX and LY. Cells were exposed to DOX (XP12BE: 10 ng/mL; MRC5 and XP30RO: 50 ng/mL) and/or 10 μ M LY, as indicated. A combination of FDA, PI and HO dyes was used to distinguish cells in early or late apoptosis from viable or necrotic cells. The cell lines used were: MRC5, XP12BE (XPA) and XP30RO (XPV). Statistical analysis, by cell line, was applied for comparing control non-treated cells with cells treated as indicated. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

XP30RO and XP12BE are extremely sensitive to higher doses of DOX (100 ng/mL), whereas MRC5 cells presented no cytotoxicity. Confirming previous results, at lower doses (12.5 ng/mL) only XP12BE manifested DOX-induced cytotoxic effects.

Thus, it is inferred that the active involvement of XPA and pol η proteins in the efficient repair of lesions caused by clinical doses of DOX is essential for cell survival.

3.2. LY294002 potentiates the cytotoxic effects of DOX in repair-deficient cells

In some tumor cells, the cytotoxic effects of DOX are enhanced by LY294002 [8,9], an inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinases (PI3Ks) and related protein kinases (PIKKs) [16–20]. Since kinases involved in DNA damage response and repair, such as ATM, ATR and DNA-PKcs, are members of the PIKK family [21,22], it was decided to analyze the effects of co-treatment with DOX and LY294002 (LY) in XP12BE and XP30RO repair-deficient cells. As shown in Fig. 4, DOX-cytotoxic effects were certainly enhanced in both, since co-treatment lead to increased levels of apoptosis. As to repair-proficient MRC5 cells, the addition of LY induced no like effect. Moreover, it was noted that, although the sensitivity profile in XP30RO is the same as in XP12BE, the response of the former to both treatments (DOX alone, and DOX plus LY) was delayed.

In order to further establish the additive cytotoxic effect of LY in DNA repair-deficient cells treated with DOX, staining experiments similar to those shown in Fig. 2 were carried out. A lower dose (10 ng/mL) of DOX was used for the treatment of XP12BE cells, seeing that at higher doses, the levels of DOX-induced death were already so high in the 48-h treatment (see Fig. 4), that it would impair the detection of any potential LY-induced increase. Again, LY strongly enhanced the effects of DOX only in XP12BE and XP30RO cells, as shown by an increase in the percentage of apoptotic cells in both when compared to treatments with DOX or LY alone. In MRC5 cells, there was no increase in cell death (Fig. 5).

Thus, deficiencies in repair processes mediated by XPA and pol η could possibly contribute to the DOX/LY synergistic cytotoxic effects observed, as the proper activity of these proteins is related to cellular resistance to this co-treatment.

3.3. Effects of DOX in the cell cycle

In several cell lines, DOX-treatment leads to cell cycle arrest, mainly in the G2/M phases [7,23,24]. As there is no mention in the literature of this in cells deficient in either XPA or pol η , DOX-effects throughout the cell cycle progression in XP12BE, XP30RO and MRC5 cells were analyzed. Direct analysis of the cycle in treated and nontreated cells demonstrated that DOX induces G2/M arrest in MRC5, XP12BE and XP30RO cell lines, as can be observed in representative histograms (Fig. 6A) and quantitative data (Fig. 6B). It was also shown that in co-treatments DOX plus LY, the arrest was more pronounced than in treatments with DOX alone. However, treatment with LY alone was not cell cycle-arrest inductive (Fig. 6). After co-treatment, G2/M arrest in MRC5 cells seemed to be even more pronounced than in both XP12BE and XP30RO (Fig. 6), even though prolonged treatment or treatment with higher doses of DOX eventually lead to the same phenotype (data not shown). This is probably due to MRC5 cell proficiency in DNA repair, which would allow for more efficient activation of the appropriated checkpoint, hence blocking more rapidly the cell cycle and giving rise to less cell death.

Thus, after treatment with DOX, cell cycle progression response is basically similar in cells proficient (MRC5) and deficient (XP12BE and XP30RO) in DNA repair, since arrest of the cell cycle in G2/M was evident in all the three. Furthermore, growth arrest was also enhanced by LY294002.

3.4. Quantification of γ H2AX in DOX-treated cells

DOX is considered a topo-II poison, and the blockage of DNA replication by this drug may lead to the formation of DSBs. In fact, cells treated with DOX show the induction of DSBs, as determined by the phosphory-

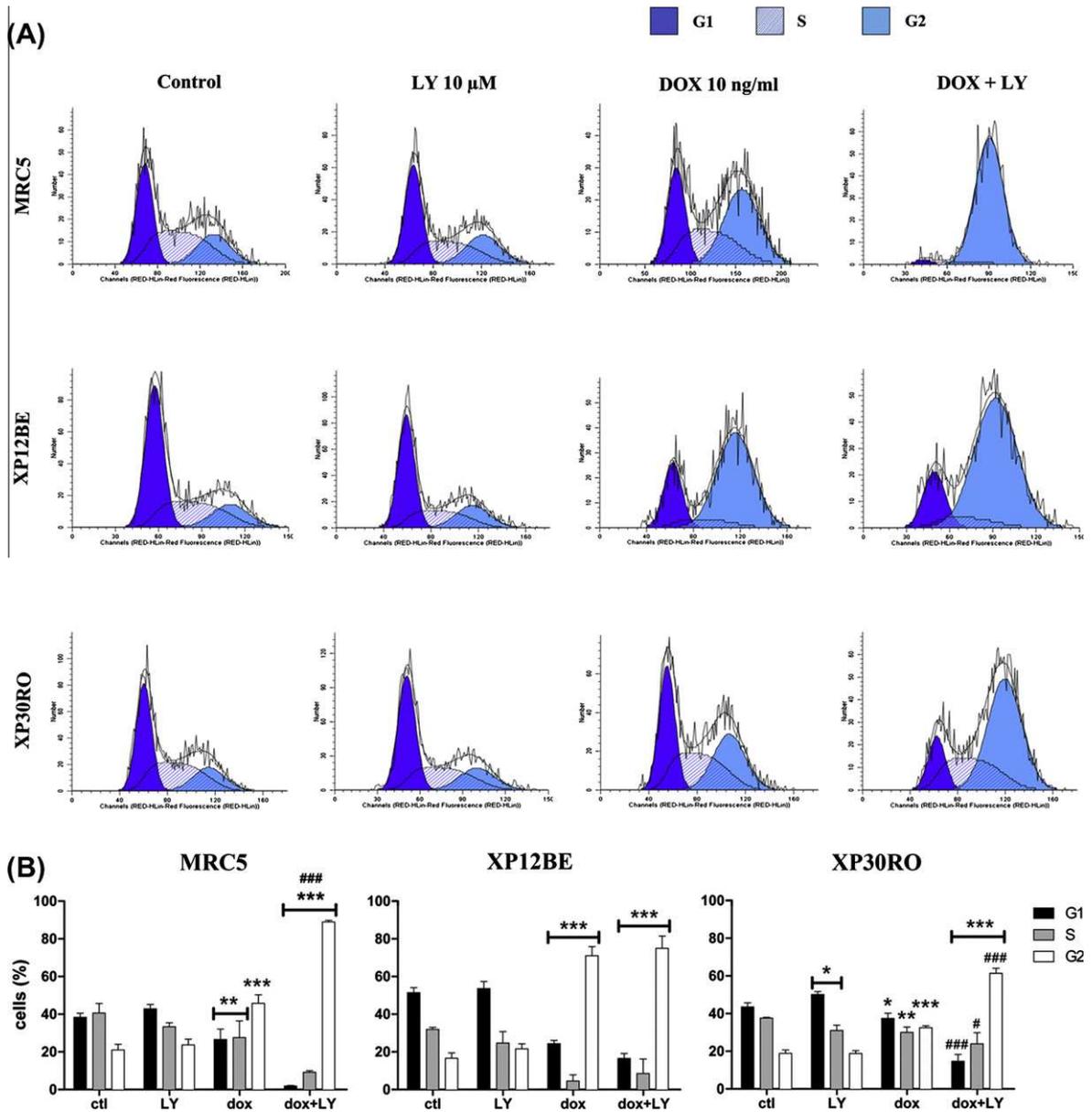


Fig. 6. DOX-induced G2/M cell cycle arrest. Cells were exposed to 10 ng/mL DOX and/or 10 μ M LY for 48 h, whereupon the cell cycle of treated and non-treated cells were analyzed with “ModFit” software. Representative histograms are shown in (A), and the quantified results in (B). The cell lines used were: MRC5, XP12BE (XPA) and XP30RO (XPV). Statistical analysis, by cell line, was applied for comparing control non-treated cells with treated cells (*), or cells treated only with DOX with cells submitted to DOX-plus-LY co-treatment (#). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

lation of H2AX histones, γ H2AX [7]. This histone modification is normally responsible for chromatin remodeling at the region of DSBs, opening access of DNA repair machineries to these lesions. Although, one would not expect a participation of NER in the repair of DSBs, DNA pol eta could well be involved in protection from these types of lesion. The induction of γ H2AX in treated cells was immunologically detected, through the cell cycle, by flow cytometry. The results, summarized in Fig. 7, indicate that continuous treatment of cells with low concentrations (10 ng/mL) of DOX leads to increased induction of γ H2AX-labeled cells, at least up to 48 h. For higher doses of DOX (50 ng/mL, for 24 h) it seems that most of the living cells appear to be labeled. Curiously, there is no clear difference on the induction of γ H2AX (in living cells) when the three cell lines are compared, although the increased induction of cell death (sub-G1) in treated XP-A and XP-V cells is confirmed. This indicates that XPA and pol eta are

not involved in the processing of DSBs. However, when the inhibitor LY is added to the cells, there is a tendency to increase the frequency of γ H2AX-labeled cells, indicating that the kinases targeted by LY may contribute to a reduction in these lesions, and also that kinase inhibition does not reduce phosphorylation of H2AX. Moreover, the labeled cells seem to be distributed in the different cell cycle phases, with a strong labeling of G2 cells, which seem to be arrested in G2/M, as commented above.

4. Discussion

DOX is one of the most commonly used chemotherapeutic drugs, with a wide range of activity against solid tumors, lymphomas and leukemias. Even though classified as a

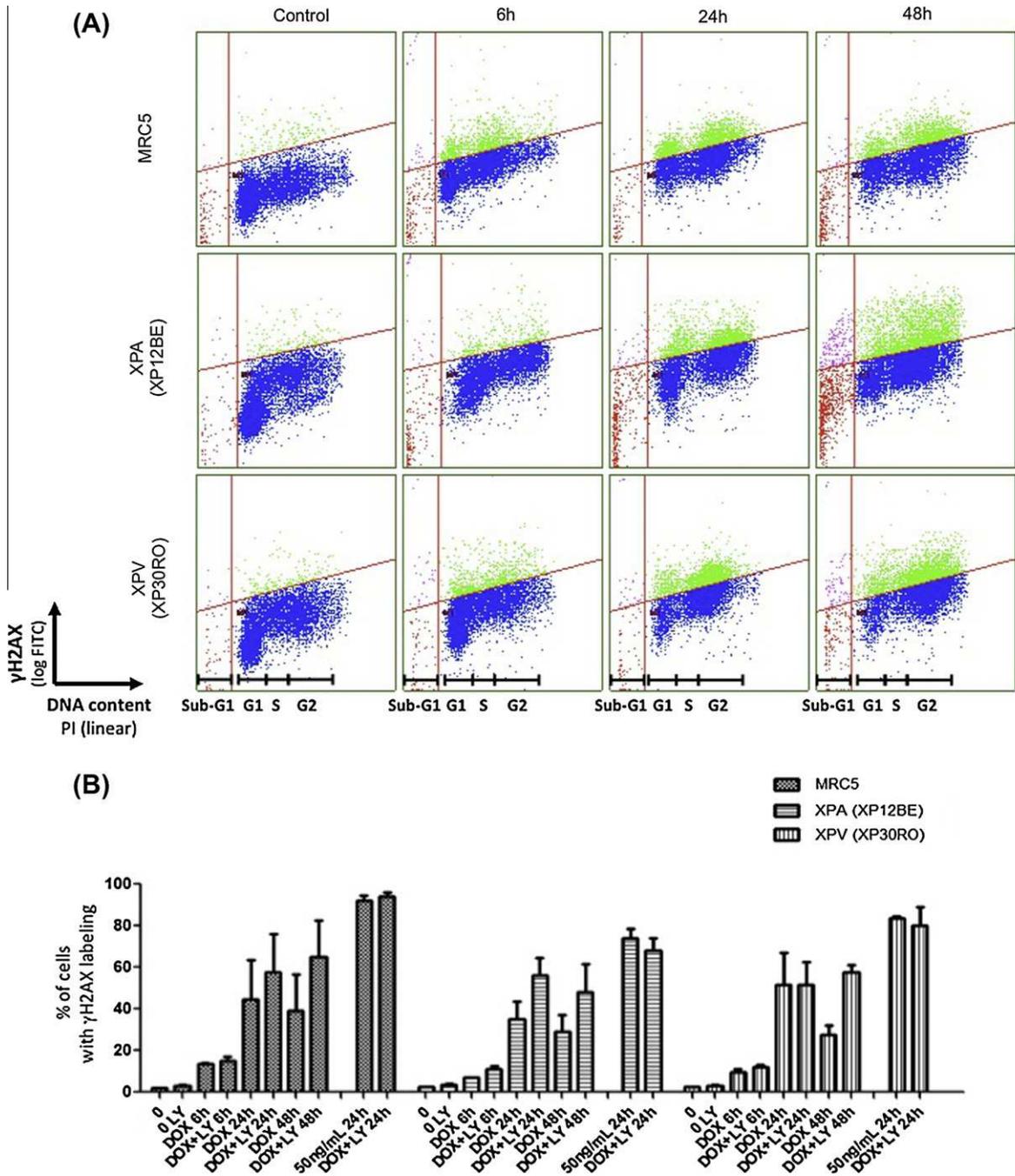


Fig. 7. Quantification, by immunodetection, of γ H2AX after DOX-treatment. Cells were exposed to DOX (10 ng/mL) and/or 10 μ M LY for the indicated periods of time (A), or to 50 ng/mL and/or LY for 24 h, as indicated. Cell cycle (PI) and γ H2AX formation were detected by flow cytometry. Results obtained only with DOX (10 ng/mL) are illustrated in (A), where γ H2AX formation is presented as a function of cell cycle phase (sub-G1, G1, S and G2 - indicated below the graphs). The quantification shown in (B) was performed only considering living cells (not considering sub-G1 cells), independently of the cell cycle phase.

topo-II inhibitor, other mechanisms of action have already been described, which relevance for specific clinical antitumoral effects remains controversial. DOX activity can generate many types of DNA damage, including DSBs, DNA cross-linking, DNA adducts and damage induced by free radical formation [1,25–30]. However, little is known about

the mechanisms and proteins involved in their repair. Recently, Saffi and colleagues demonstrated that the helicase XPD, a member of the NER pathway, is involved in the repair of DOX-induced lesions, as XPD-deficient cells are more sensitive to treatments with DOX [7]. This is contrary to a previous report showing that rodent cells deficient

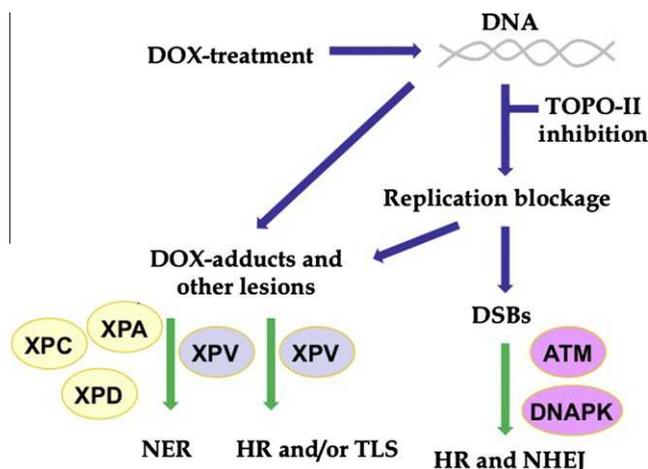


Fig. 8. Scheme indicating potential DNA repair pathways involved in DOX-induced DNA damage. Mechanisms for the induction of DNA damage by DOX are indicated by blue arrows, while DNA repair and damage response pathways are indicated in green arrows. The proteins represented within circles provide potential targets to potentiate the chemotherapy effects of DOX to induce tumor cell killing (only those discussed in the text are shown). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

in XPD, XPB or XPG, are more tolerant to DOX-induced DNA adducts [31]. The fact that, in the latter case, rodent cells (instead of human cells) were treated with DOX for only 4 h [31], might account for differences between the two reports. There is also evidence that XPA, XPC [6], DNA-PKcs [2] and ATM [27] are somehow involved in repairing these lesions. In order to better understand how DOX-induced DNA lesions are processed, the response of cells proficient and deficient in DNA repair to treatments with DOX was investigated.

Previously, DOX-induced DNA damage was identified through comet assays [6,7]. Herein, it is shown that both XPA and pol eta are necessary for the effective repair of DNA lesions induced by clinical doses of DOX, since cells deficient in these proteins are more sensitive to the cytotoxic effects of DOX treatment than MRC5 cells, which are proficient in DNA repair mechanisms (Figs. 1–3). On the other hand, the absence of the endonuclease XPF does not render cells more sensitive to clinical doses of DOX (Fig. 1). Since the importance of NER in the repair of DOX-induced lesions has been shown, it is possible that the residual NER activity normally observed in XPF cell lines is sufficient to avoid cell death [15], as compared to XPA cells that are >95% DNA repair deficient. In addition, cell cycle analysis demonstrated that DOX induces G2/M arrest in all the cell lines (Fig. 6). Whereas XPA is a member of the NER pathway, pol eta is traditionally considered to be a member of the TLS pathway, which bypasses unrepaired lesions by way of a series of error-prone translesion DNA polymerases [3,32]. Nevertheless, it has been shown that pol eta also participates in the process of homologous recombination (HR) [33,34]. As both processes, TLS and HR, act mainly in the S phase of the cell cycle, S phase arrest in XP3ORO cells after treatment with DOX was expected. Instead, G2/M arrest was observed, with high levels of γ H2AX-labeled cells. If this is so, pol eta-induced protection against DOX treatments would not involve HR, but a third undetermined pathway.

It is believed that pol eta could be necessary to allow late replication of sequences with specific structures that may be produced spontaneously or in the presence of DNA lesions, such as stalled replication forks, G4-tetraplex sequences [35] or fragile site sequences [36]. In fact, many DNA polymerases have either cooperative or redundant roles and participate in more than one cellular process. For example, Auclair and colleagues showed that functional DNA polymerase eta is important for GGR during the S phase [37], and other authors have also proposed that DNA polymerase eta might play a role in NER [38,39]. Whether this polymerase is required for the NER repair of DOX-induced DNA damage is an issue that requires further study. Preliminary work indicated that silencing of pol eta expression in XP-A cells (by shRNA knock down) do not change the levels of cell killing by DOX-treatment (Fig. 1S, Supplementary Data), indicating that pol eta and XPA could, in fact, operate in the same pathway. That would indicate that pol eta could be involved in the NER synthesis step. This, however, should be considered carefully, as these cells also did not had increased killing by UV-damage (Fig. 1S, C), and thus the reduction of XPV proteins in the cells could not be enough for an observable effect.

Finally, LY294002, an inhibitor of PI3Ks and PIKKs, was found to enhance DOX cytotoxic effects only in the DNA repair deficient cell lines, XP12BE and XP3ORO (Figs. 4 and 5). Some of the kinases inhibited by LY, viz., ATM, ATR and DNA-PKcs, play important roles in DSB signaling and repair [21,22], and this is in agreement with the observation that the number of γ HAX-labeled cells increases in DOX-treated cells. Together with the synergistic effect of LY in the cell killing of XP-A and XP-V cells, these results clearly indicate that these kinases signal and help to process DSBs, which are probably induced by the presence of lesions not repaired by NER or pol eta. The lack of specificity of LY, however, do not provide a direct information on the type of kinase(s) related to the repair of such lesions, when induced by DOX-treatment. The involvement of DNA-PKcs

in DSB repair by NHEJ, thereby implying the possible participation of this pathway in the repair of DOX-induced DSBs, is in accordance with previous work [2]. The activation of ATM in DOX-treated human lymphoblastoid cells have also been reported, indicating that this kinase is also involved in the cell responses triggered by this drug [27]. It is tempting to consider the possibility of a mechanistic link among these proteins, in a direct cross-talk between different repair pathways. Even though currently the existence of such a link is no more than speculation, it would be interesting to investigate this further.

Taken together, the results shed light onto how DOX-induced DNA damages are repaired. In Fig. 8, a model summarizing the data and identifying possible pathways involved in the processing of the different types of lesions induced by DOX is presented. This model facilitates the identification of the novel potential targets that can be clinically tested with DOX, so as to improve the outcome of chemotherapeutic treatment with this drug. Corroborating our model, recent data indicate that tumors from a BRCA-defective background, that should be partially deficient in recombination of DSB, appear to be more sensitive to pegylated liposomal doxorubicin [40]. Besides increasing the quality in the treatment received by thousands of patients worldwide, it is possible that in a not so distant future, the repair capacity of tumor cells will be addressed before the beginning of a treatment, and thus patients with impaired capacity will be more apt candidates for chemotherapy with DOX than patients with enhanced capacity.

Acknowledgements

M.C.S. Moraes has a post-doctoral fellowship from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil). This research was supported by FAPESP (São Paulo, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brazil) and USP-COFECUB (São Paulo, Brazil).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.canlet.2011.09.019](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.019).

References

- [1] D.A. Gewirtz, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 727–741.
- [2] C. Friesen, M. Uhl, U. Pannicke, K. Schwarz, E. Miltner, K.M. Debatin, DNA-ligase IV and DNA-PK play a critical role in deficient caspases activation in apoptosis-resistant cancer cells using doxorubicin, *Mol. Biol. Cell* (2008).
- [3] R.M. Costa, V. Chigancas, S. Galhardo Rda, H. Carvalho, C.F. Menck, The eukaryotic nucleotide excision repair pathway, *Biochimie* 85 (2003) 1083–1099.
- [4] C.J. Park, B.S. Choi, The protein shuffle. Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway, *Febs J.* 273 (2006) 1600–1608.
- [5] A. Gratchev, P. Strein, J. Utikal, G. Sergij, Molecular genetics of Xeroderma pigmentosum variant, *Exp. Dermatol.* 12 (2003) 529–536.
- [6] H. Carvalho, L.M. Garrido, R.L. Furlan, G. Padilla, M. Agnoletto, T. Guecheva, J.A. Henriques, J. Saffi, C.F. Menck, DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65 (2010) 989–994.
- [7] J. Saffi, M.H. Agnoletto, T.N. Guecheva, L.F. Batista, H. Carvalho, J.A. Henriques, A. Stary, C.F. Menck, A. Sarasin, Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells, *DNA Repair (Amst)* 9 (2010) 40–47.
- [8] R. Abdul-Ghani, V. Serra, B. Gyorffy, K. Jurchott, A. Solf, M. Dietel, R. Schafer, The PI3K inhibitor LY294002 blocks drug export from resistant colon carcinoma cells overexpressing MRP1, *Oncogene* 25 (2006) 1743–1752.
- [9] Y.A. Wang, S.K. Johnson, B.L. Brown, L.M. McCarragher, K. Al-Sakkaf, J.A. Royds, P.R. Dobson, Enhanced anti-cancer effect of a phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor and doxorubicin on human breast epithelial cell lines with different p53 and oestrogen receptor status, *Int. J. Cancer* 123 (2008) 1536–1544.
- [10] L. Proietti De Santis, A.S. Balajee, C. Lorenti Garcia, G. Pepe, A.M. Worboys, F. Palitti, Inhibition of p53, p21 and Bax by pifithrin-alpha does not affect UV induced apoptotic response in CS-B cells, *DNA Repair (Amst)* 2 (2003) 891–900.
- [11] J.Z. Xing, L. Zhu, S. Gabos, L. Xie, Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity, *Toxicol. In Vitro* 20 (2006) 995–1004.
- [12] J.M. Boyd, L. Huang, L. Xie, B. Moe, S. Gabos, X.F. Li, A cell-microelectronic sensing technique for profiling cytotoxicity of chemicals, *Anal. Chim. Acta* 615 (2008) 80–87.
- [13] T.E. Kute, L. Savage, J.R. Stehle Jr., J.W. Kim-Shapiro, M.J. Blanks, J. Wood, J.P. Vaughn, Breast tumor cells isolated from in vitro resistance to trastuzumab remain sensitive to trastuzumab anti-tumor effects in vivo and to ADCC killing, *Cancer Immunol. Immunother.* 58 (2009) 1887–1896.
- [14] A. Bapat, L.S. Glass, M. Luo, M.L. Fishel, E.C. Long, M.M. Georgiadis, M.R. Kelley, Novel small-molecule inhibitor of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 blocks proliferation and reduces viability of glioblastoma cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334 (2010) 988–998.
- [15] A.M. Sijbers, P.C. van Voorst Vader, J.W. Snoek, A. Raams, N.G. Jaspers, W.J. Kleijer, Homozygous R788W point mutation in the XPF gene of a patient with xeroderma pigmentosum and late-onset neurologic disease, *J. Invest. Dermatol.* 110 (1998) 832–836.
- [16] C.J. Vlahos, W.F. Matter, K.Y. Hui, R.F. Brown, A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002), *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 5241–5248.
- [17] K.E. Rosenzweig, M.B. Youmell, S.T. Palayoor, B.D. Price, Radiosensitization of human tumor cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 correlates with inhibition of DNA-dependent protein kinase and prolonged G2-M delay, *Clin. Cancer Res.* 3 (1997) 1149–1156.
- [18] R.A. Izzard, S.P. Jackson, G.C. Smith, Competitive and noncompetitive inhibition of the DNA-dependent protein kinase, *Cancer Res.* 59 (1999) 2581–2586.
- [19] C.A. Hall-Jackson, D.A. Cross, N. Morrice, C. Smythe, ATR is a caffeine-sensitive, DNA-activated protein kinase with a substrate specificity distinct from DNA-PK, *Oncogene* 18 (1999) 6707–6713.
- [20] T. Stiff, M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Loblrich, P.A. Jeggo, ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation, *Cancer Res.* 64 (2004) 2390–2396.
- [21] K. Hiom, DNA repair: how to PIKK a partner, *Curr. Biol.* 15 (2005) R473–475.
- [22] H. Lempiainen, T.D. Halazonetis, Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks, *EMBO J.* 28 (2009) 3067–3073.
- [23] K.M. Bernt, D.S. Steinwaerder, S. Ni, Z.Y. Li, S.R. Roffler, A. Lieber, Enzyme-activated prodrug therapy enhances tumor-specific replication of adenovirus vectors, *Cancer Res.* 62 (2002) 6089–6098.
- [24] H.C. Graat, M.A. Witlox, F.H. Schagen, G.J. Kaspers, M.N. Helder, J. Bras, G.R. Schaap, W.R. Gerritsen, P.I. Wuisman, V.W. van Beusechem, Different susceptibility of osteosarcoma cell lines and primary cells to treatment with oncolytic adenovirus and doxorubicin or cisplatin, *Br J. Cancer* 94 (2006) 1837–1844.
- [25] H.G. Keizer, H.M. Pinedo, G.J. Schuurhuis, H. Joenje, Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity, *Pharmacol. Ther.* 47 (1990) 219–231.
- [26] S.M. Cutts, L.P. Swift, A. Rephaeli, A. Nudelman, D.R. Phillips, Sequence specificity of adriamycin-DNA adducts in human tumor cells, *Mol. Cancer Ther.* 2 (2003) 661–670.
- [27] E.U. Kurz, P. Douglas, S.P. Lees-Miller, Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 53272–53281.

- [28] L.P. Swift, A. Rephaeli, A. Nudelman, D.R. Phillips, S.M. Cutts, Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death, *Cancer Res.* 66 (2006) 4863–4871.
- [29] J.M. Berthiaume, K.B. Wallace, Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity, *Cell Biol. Toxicol.* 23 (2007) 15–25.
- [30] D.J. Burgess, J. Doles, L. Zender, W. Xue, B. Ma, W.R. McCombie, G.J. Hannon, S.W. Lowe, M.T. Hemann, Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 9053–9058.
- [31] D.M. Spencer, R.A. Bilardi, T.H. Koch, G.C. Post, J.W. Nafie, K. Kimura, S.M. Cutts, D.R. Phillips, DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair, *Mutat. Res.* 638 (2008) 110–121.
- [32] Z. Livneh, O. Ziv, S. Shachar, Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis, *Cell Cycle* 9 (2010) 729–735.
- [33] T. Kawamoto, K. Araki, E. Sonoda, Y.M. Yamashita, K. Harada, K. Kikuchi, C. Masutani, F. Hanaoka, K. Nozaki, N. Hashimoto, S. Takeda, Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis, *Mol. Cell* 20 (2005) 793–799.
- [34] M.J. McIlwraith, A. Vaisman, Y. Liu, E. Fanning, R. Woodgate, S.C. West, Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination, *Mol. Cell* 20 (2005) 783–792.
- [35] R. Betous, L. Rey, G. Wang, M.J. Pillaire, N. Puget, J. Selves, D.S. Biard, K. Shin-ya, K.M. Vasquez, C. Cazaux, J.S. Hoffmann, Role of TLS DNA polymerases eta and kappa in processing naturally occurring structured DNA in human cells, *Mol. Carcinog.* 48 (2009) 369–378.
- [36] L. Rey, J.M. Sidorova, N. Puget, F. Boudsocq, D.S. Biard, R.J. Monnat Jr., C. Cazaux, J.S. Hoffmann, Human DNA polymerase eta is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 3344–3354.
- [37] Y. Auclair, R. Rouget, J.M. Belisle, S. Costantino, E.A. Drobetsky, Requirement for functional DNA polymerase eta in genome-wide repair of UV-induced DNA damage during S phase, *DNA Repair (Amst)* 9 (2010) 754–764.
- [38] G. Soria, L. Belluscio, W.A. van Cappellen, R. Kanaar, J. Essers, V. Gottifredi, DNA damage induced Pol eta recruitment takes place independently of the cell cycle phase, *Cell Cycle* 8 (2009) 3340–3348.
- [39] Y.W. Chen, J.E. Cleaver, F. Hanaoka, C.F. Chang, K.M. Chou, A novel role of DNA polymerase eta in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents, *Mol. Cancer Res.* 4 (2006) 257–265.
- [40] T. Safra, B. Lucia, M.O. Nicoletto, L. Rolnitzky, S. Pelles-Avraham, R. Geva, M.E. Donach, J. Curtin, A. Novetsky, T. Grenader, W.C. Lai, A.A. Gabizon, L. Boyd, F.M. Muggia, BRCA mutation status and determinant of outcome in women with recurrent epithelial ovarian cancer treated with pegylated liposomal doxorubicin, *Mol. Cancer Ther.* (2011).