HAL
open science

Fonctions et régulations des protéines PARP2 et de XRCC1 dans la réparation des dommages à l'ADN

Alexis Fouquin

▶ **To cite this version:**

Alexis Fouquin. Fonctions et régulations des protéines PARP2 et de XRCC1 dans la réparation des dommages à l'ADN. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS236 . tel-01878353

HAL Id: tel-01878353

https://theses.hal.science/tel-01878353v1

Submitted on 21 Sep 2018

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.

NNT : 2017SACLS236

Fonctions et régulations des protéines PARP2 et XRCC1 dans la réparation des dommages à l'ADN

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°582 CMBS Cancérologie – Médecine - Santé
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 15 Septembre 2017, par

Alexis Fouquin

Composition du Jury :

Dr. Pascale Bertrand Directrice de recherche, Université Paris-Diderot (UMR9637)	Présidente
Dr. Françoise Dantzer Directrice de recherche, Université de Strazbourg (UMR7242)	Rapporteur
Dr. Yvan Canitrot Chargé de recherche, Université Toulouse III (UMR5088)	Rapporteur
Dr. Sarah Lambert Directrice de recherche, Université Paris-Saclay (UMR3348)	Examinatrice
Dr. Vincent Pennaneach Chargé de recherche, Université Paris-Saclay (UMR3348)	Directeur de thèse

Thèse de doctorat

Remerciements

Je voudrais tout d'abord commencer par remercier tous les organismes qui m'ont financé durant les quatre années de mon doctorat ainsi que durant les 9 mois de stages qui ont précédés : MESR, ARC, Institut Curie, Université Paris Sud, INSERM et CNRS. Rien de tout ce qui suit n'aurait été possible sinon.

Egalement je remercie sincèrement les docteurs Françoise Dantzer, Yvan Canitrot, Pascale Bertrand, Erika Brunet et Sarah Lambert qui ont accepté d'évaluer les travaux que j'ai effectués au cours de mon doctorat. Un remerciement particulier au docteur Pascale Bertrand, qui a suivi et conseillé mes travaux lors de mon comité de thèse.

Je remercie aussi les docteurs Josée Guirouilh-Barbat et Bernard Lopez pour cette collaboration fructueuse ainsi que pour leurs conseils et relectures avisés. Ma thèse n'aurait pas la forme qu'elle a aujourd'hui sans eux.

Je voudrais aussi remercier Janet très chaleureusement pour m'avoir accueilli dans son équipe pour deux stages ainsi que pour y réaliser mon doctorat. De même, je te remercie énormément Mounira pour nous avoir accueilli dans ton équipe Vincent et moi, alors même que Janet partait à Lyon pour de nouvelles aventures. Tu t'es investi dans mon projet alors que j'arrivais avec ma propre thématique et n'a jamais émis la moindre objection à ce que je poursuive mes propres recherches au sein de ton équipe. Je te remercie également de tout ce que tu as fait pour me permettre de continuer ma thèse dans les meilleures conditions possibles.

Je souhaiterais adresser une pensée particulière à mon directeur de thèse, le docteur Vincent Pennaneach. Vincent, après m'avoir encadré pendant deux stages en 2011 et 2013, ainsi que durant les quatre années de ma thèse, je te considère comme un directeur, un collaborateur mais aussi un ami. Tu m'as donné gout à la recherche et m'as insufflé une rigueur ainsi que l'envie d'aller jusqu'au bout des choses. Tu as toujours été présent, dans les hauts comme dans les bas, et

de savoir que tu étais toujours présent pour toutes mes questions mêmes stupides, a rendu ma thèse « presque » facile. Ces discussions que nous avions, scientifiques ou non, me manqueront beaucoup à l'avenir. Je pourrais encore continuer encore longtemps, mais je vais m'arrêter et te dire simplement merci du fond du cœur.

Je tiens aussi à remercier tous les anciens membres de l'U612. A Laury, Charlotte et Sara qui ont chacune poursuivit leur route maintenant. Merci pour tous ces moments, pour vos encouragements, ainsi que pour ces petites attentions sucrées qui faisaient ravir les papilles de toute l'unité ! J'espère vraiment que vous êtes épanouies dans vos parcours respectifs.

A tous les membres de l'équipe, merci beaucoup pour m'avoir intégré, écouté et conseillé tous ces lundis matins. Même si nous n'avions pas la possibilité de se croiser régulièrement, je garde de ces réunions un souvenir très agréable et extrêmement enrichissant scientifiquement. Félicitation à toi Hamza, tu mérites tellement ce poste et j'espère que Montpellier te plaira à toi et à toute ta famille. Elias, félicitation pour ton article ! Je te souhaite le meilleur pour la suite dans ton nouveau poste. A vous deux Matthieu et Sandra, je vous adresse tous mes vœux de réussite pour la fin de vos projets. Sandra, tu touches presque au but ! Avec cette quatrième année, je suis persuadé que tu vas réaliser une thèse formidable. Bravo à toi Simon, pour ta thèse grandiose. J'espère que ton post-doc te plaît mais au vu de tes qualités, ton succès ne fait aucun doute. Et enfin, merci beaucoup à Rosine et Géraldine pour tous leurs conseils avisés lorsque que je suis venu leur demander de l'aide. Votre expérience m'a été d'un grand secours.

Finalement, je tiens à préciser que je ne serais pas arrivé jusqu'ici sans le soutien inconditionnel de ma famille. Depuis le début de ma scolarité, j'ai pu bénéficier de leur assistance et de leurs encouragements qui m'ont permis d'avancer et de grandir, et je les remercie avec amour pour cela. A toi Kelly, sans qui je n'aurais pas tenu jusqu'ici. La voie que tu as choisie nous sépare momentanément par un océan, mais nous serons bientôt réunis pour le meilleur et pour le pire.

A vous tous et à tous ceux que j'ai pu oublier : Merci !!!

Table des matières

REMERCIEMENTS **3**

TABLE DES MATIERES **5**

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX **9**

LISTES DES ABREVIATIONS **11**

AVANT-PROPOS **19**

INTRODUCTION **21**

CHAPITRE 1 :

LE METABOLISME DE L'ADP-RIBOSE **22**

1. La PARylation *23*

2. La MARylation *26*

3. Les écrivains *28*

3.1 La famille des PARPs 28

3.1.1 Les PARPs dépendantes de l'ADN 28

3.1.2 Les Tankyrases 32

3.1.3 Les PARPs à doigt de zinc CCCH 33

3.1.4 Les PARPs contenant un macrodomaine ou macroPARPs 34

3.1.5 Les PARPs non classifiées 34

3.2 Les sirtuines 36

4. Les lecteurs *37*

4.1 Le motif PBM 38

4.2 Le motif PBZ 38

4.3 Le macrodomaine 39

4.4 Le motif WWE 39

4.5 Les domaines de reconnaissance de phophorylations (BRCT/FHA) 40

4.6 Les domaines d'interaction avec l'ADN ou l'ARN 40
5. Les gommeurs 43
5.1 La protéine PARG 44
5.2 La protéine ARH3 46
5.3 La protéine TARG1 47
5.4 Les protéines MacroD1 et MacroD2 47

CHAPITRE 2 :

LES FONCTIONS DES PROTEINES PARP1, PARP2 ET PARP3 AU COURS DE LA REPARATION DE L'ADN 49

1. PARP et BER 52
1.1 La reconnaissance des dommages de base : les glycosylases 52
1.2 Détection des cassures simple-brin 57
1.3 Nettoyage des extrémités d'ADN 62
1.4 Synthèse d'ADN et jonction des extrémités 64
1.5 La protéine XRCC1 66
1.5.1 Structure de la protéine XRCC1 67
1.5.2 XRCC1 et cancer 71
2. Les PARPs et la réparation des cassures double-brins de l'ADN 75
2.1 La voie canonique de jonction des extrémités 77
2.1.1 La reconnaissance des extrémités 78
2.1.2 Protection et maintien des extrémités 82
2.1.3 La maturation des extrémités 82
2.1.4 La ligation des extrémités 83
2.1.5 Importance de la voie du C-EJ 84
2.1.6 Les rôles des PARPs lors du C-EJ 84
2.2 La recombinaison homologue 87
2.2.1 La résection des extrémités 88
2.2.2 L'envahissement de la chromatide sœur et la recombinaison 94
2.2.3 Les fonctions cellulaires de la recombinaison homologue 96
2.2.4 Les rôles des PARPs lors de la recombinaison homologue 97
2.3 La voie de réparation du SSA 99
2.4 PARP et la voie alternative de jonction des extrémités 102
3. Le choix des voies de la réparation des cassures double-brins 107
3.1 L'impact de la nature des extrémités 108
3.2 L'impact de la position de la cassure 109

3.3 L'impact de BRCA1 et de 53BP1 110
3.3.1 La protéine 53BP1et ses partenaires protéiques 112
3.3.2 La protéine BRCA1 115
4. Les inhibiteurs de PARP 118
4.1 Le mécanisme d'action des inhibiteurs de PARP 120
4.2 Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de PARP 122

CHAPITRE 3 :
LES AUTRES FONCTIONS DE LA PROTEINE PARP2 125

1. PARP2 et cycle cellulaire 126
2. PARP2 et architecture de la chromatine 128
3. PARP2 et ségrégation chromosomique 129
4. PARP2 et maintien des télomères 130
5. PARP2 et métabolisme 131

RESULTATS 135

PREMIERE PARTIE : PARP2, SURVIE CELLULAIRE ET METABOLISME DES PAR 136

Introduction 137
Résultats 138

SECONDE PARTIE : PARP2 CONTROLE LE CHOIX DES VOIES DE LA REPARATION DES CASSURES DOUBLE-BRINS DE L'ADN EN LIMITANT LE RECRUTEMENT DE 53BP1 ET EN STIMULANT LA RESECTION DES EXTREMITES 154

Introduction 155
Résultats 161
Résultats non publiés 203

TROISIEME PARTIE : LA DEPHOSPHORYLATION DE LA PROTEINE PLATEFORME XRCC1 REGULE SON RECRUTEMENT AUX SITES DE DOMMAGES DE L'ADN 207

Introduction 208
Résultats 212

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 251

1. *PARP2 et le métabolisme des PAR 252*
2. *PARP1, PARP2 et réparation des CDBs 255*
3. *L'activité de PARP2 au sein de la réparation de l'ADN 256*
4. *Le lien entre PARP2 et 53BP1 ..... 257*
5. *Le lien entre PARP2 et BRCA1 ..... 264*
6. *PARP2 et cancer 267*
7. *Le lien entre PARP2 et XRCC1 ..... 268*
8. *Les modifications post-traductionnelles de XRCC1 par phosphorylation 269*

CONCLUSION 276

ANNEXE : RESUME DES SEQUENCES AUX POINTS DE JONCTION DES EXTREMITES 279

BIBLIOGRAPHIE 295

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : La reaction d'ADP-ribosylation 24
Figure 2 : La famille des PARPs 29
Figure 3 : Les differents domaines des proteines PARP1, PARP2 et PARP3 30
Figure 4 : Les differents modules de reconnaissance de l'ADP-ribose 37
Figure 5 : Le domaine PBM 38
Figure 6 : Le cycle de l'ADP-ribosylation 44
Figure 7 : Structure du site catalytique de la proteine PARG 46
Figure 8 : Les differents types de dommages de l'ADN 50
Figure 9 : Resume de la voie du BER-SSBR. 54
Figure 10 : Les causes physiologiques et consequences des cassures simple-brin 58
Figure 11 : Mecanismes de modification de la structure de la chromatine par PARP1 60
Figure 12 : Structure et partenaires de la proteine XRCC1 68
Figure 13 : Les types de cassures doubles-brins de l'ADN 76
Figure 14 : Les principales etapes de la voie canonique de jonction des extremites 79
Figure 15 : L'assemblage du complexe de reparation des CDBs par jonction canonique des extremites 81
Figure 16 : Organisation structurelle du complexe MRN-CtIP 91
Figure 17 : Les etapes de la resection des extremites. 93
Figure 18 : Les etapes finales de la recombinaison homologue 95
Figure 19 : Les etapes de la reparation des CDBs par la voie du SSA 101

FIGURE 20 : L'INITIATION DE LA RESECTION EST COMMUNE A LA RH, AU SSA ET AU ALT-EJ 104

FIGURE 21 : LES ETAPES DE LA VOIE ALTERNATIVE DE JONCTION DES EXTREMITES DEPENDANTES DE LA POLYMERASE Θ 106

FIGURE 22 : LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DEPENDANTE D'ATM AU NIVEAU DE LA CHROMATINE 111

FIGURE 23 : NIVEAU DE DEVELOPPEMENT DES DIFFERENTS INHIBITEURS DE PARP : UN ETAT DES LIEUX EN 2017 120

FIGURE 24 : MECANISME DE REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE C-MYC PAR PARP2 127

FIGURE 25 : REGULATION DE LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE PAR PARP2 133

FIGURE 26 : DESCRIPTION DU SUBSTRAT D'ANALYSE DES VOIES DE JONCTION DES EXTREMITES 158

FIGURE 27 : DESCRIPTION DU SUBSTRAT DR-GFP 159

FIGURE 28 : LA DEPLETION DE PARP2 N'AFFECTE PAS LA RESISTANCE DES FOYERS 53BP1 A UN INHIBITEUR DU PROTEASOME 204

FIGURE 29 : PARP2 INTERAGIT AVEC RIF1 ET KU80. 205

FIGURE 30 : PARP2 N'AFFECTE PAS LA FORMATION DES FOYERS RIF1 EN REPONSE AUX DOMMAGES A L'ADN 206

FIGURE 31 : MODELE EXPLIQUANT LA CONTRIBUTION DE PARP2 DANS LA REGULATION DU CHOIX DES VOIES DE LA REPARATION DES CASSURES DOUBLE-BRINS DE L'ADN. 266

TABLEAU 1 : EFFET DE LA MARYLATION DES TOXINES BACTERIENNES SUR LES CELLULES HOTES 27

TABLEAU 2 : LES DIFFERENTS TYPES DE GLYCOSYLASES ET LEURS SUBSTRATS 56

TABLEAU 3: SUBSTRATS DES DIFFERENTES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LE NETTOYAGE DES EXTREMITES BLOQUANTES EN 5' ET EN 3' 63

Listes des abréviations

3AB : 3-Aminobenzamide

53BP1 : TP53-binding protein 1

ABCA1 : ATP-binding cassette transporter 1

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP-ribose : Adénosine Diphosphate Ribose

AID : Activation-induced cytidine deaminase

ALC1 : Amplified in Liver Cancer 1

Alt-EJ : Voie alternative de junction des extrémités

APE1 : Apurinic-apyrimidinic endonuclease 1

APLF : Aprataxin and PNK-like factor

APTX : Aprataxin

ARH : Aryl Hydrocarbon Receptor

ARH3 : ADP-ribosyl hydrolase 3

ARN : Acide ribonucléique

ATM : Ataxia telangiectasia mutated

ATR : Ataxia telangiectasia mutated and Rad3- related

BARD1 : BRCA1 associated RING domain 1

BCL2L : Bcl-2-like protein 2

BER : Base excision repair

BIR : Break-induced replication

BRCA1/2 : Breast Cancer type 1/2 susceptibility protein

BRCT : BRCA1 C-terminal

BUB1 : Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1

CCCH : Cystidine-Cystidine-Cystidine-Histidine

CDB : Cassure double-brins

CDK : Cyclin Dependent Kinase

CENP : Centromeric protein

CHD2 : Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 2

CHFR : Checkpoint with forkhead and ring finger domains

CHK1/2 : Checkpoint Kinase 1/2

CK2 : Caséine Kinase 2

CSB : Cassure simple-brin

DNA-PK(cs) : DNA-dependent protein kinase (catalytic subunit)

DSBR : Double-strand break repair

EGF : Epidermal growth factor

ERCC1 : DNA excision repair protein ERCC-1

EXO1 : Exonuclease 1

FEN1 : Flap structure-specific endonuclease 1

FHA : Forkhead Associated

FOXO1 : Forkhead box protein O1

Fus : RNA-binding protein FUS

GEN1 : Flap endonuclease GEN homolog 1

HEAT : Huntington-elongation-A-subunit-TOR

HP1 : Heterochromatin Protein 1

HO Endonucléase : Homothallic switching endonuclease

HOXA9 : Homeobox protein Hox-A9

HSP90 : Heat shock protein HSP 90

hSSB1/2 : Single-stranded DNA-binding protein 1/2

IRE1α : Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease

JMJD2A : Jumonji domain-containing protein 2A

JMJD1C : Jumonji domain-containing protein 1C

KAP1 : KRAB-associated protein 1

kDa : kiloDalton

KO : Knockout

L3MBTL1 : Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1

MacroD1/2 : O-acetyl-ADP-ribose deacetylase

MAD2L2 : Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2B

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MAR : Mono(ADP-ribose)

MARylation : Mono(ADP-ribose)ylation

MDC1 : Mediator of DNA damage checkpoint protein 1

MEF : Mouse embryonic fibroblast

MLH1 : DNA mismatch repair protein Mlh1

MDR1 : Multidrug resistance protein 1

MMEJ : Microhomology mediated end-joining

MMR : Mismatch repair

MMS : Methyl methanesulfonate

MRE11 : Meiotic recombination 11 homolog 1

MRN : MRE11-RAD50-NBS1

NAD+ : Nicotinamide adénine dinucleotide

NBS1 : Nijmegen breakage syndrome protein 1 or Nibrin

NER : Nucleotide excision repair

NF-κB : NF-nuclear factor-kappa B

NLS : Signal de localisation nucléaire

NuMa : Nuclear mitotic apparatus protein 1

OB : oligonucleotide/oligosaccharide-binding

PALB2 : Partner and localizer of BRCA2

PAR : Poly(ADP-ribose)

PARG : Poly(ADP-ribose) glycohydrolase

PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase

PARylation : Poly(ADP-ribose)ylation

PAXX : Paralog of XRCC4 and XLF

PBM : PAR-binding motif

PBZ : PAR-binding zinc finger

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

PERK : PRKR-like endoplasmic reticulum kinase

pI : point isoélectrique

PIKK : Phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase-like kinase

PIN : PilT N-terminus

PGC-1α : PPAR-gamma coactivator 1-alpha

PNKP : Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase

PP5 : Serine/threonine-protein phosphatase 5

PPARγ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PTIP : PAX-interacting protein 1

RAD50 to 52 : DNA repair protein RAD50 to 52

RAG1/2 : V(D)J recombination-activating protein

RB : Retinoblastoma-associated protein

RECQ1 : ATP-Dependent DNA Helicase Q1

RFC : Replication Factor C complex

RIF1 : Telomere-associated protein RIF1

RNAse H1 : ribonucléase H1

ROS : Dérivé réactif de l'oxygène

RPA : Replication protein A complex

RRM : RNA recognition motif

SAM : Sterile α-motif

SAP : SAF-A/B, Acinus and PIAS

SDSA Synthesis dependent strand annealing

SETD2 : SET domain-containing protein 2

SINEs : Short Interspersed Nuclear Elements

SIRT1 : NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1

SMARCAD1 : SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1

SNP : Single-nucleotide polymorphism

SPO11 : Meiotic recombination protein SPO11

SREBP1 : Sterol regulatory element-binding protein 1

SSA : Single-strand annealing

SSBR : Single-strand break repair

STAT6 : Signal Transducer and Activator of Transcription 6

TARG1 : Terminal ADP-ribose protein glycohydrolase

TCCP : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine

TiPARP : ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin-like 14

TIRR : Tudor interacting repair regulator

TOP1 : DNA Topoisomérase 1

TRF1/2 : Telomeric repeat-binding factor 1/2

UBC13 : Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N

UHRF1 : Ubiquitin-like PHD and RING finger domain-containing protein 1

Ung : Uracil-DNA glycosylase

UTR : Untranslated region

Wnt : Wingless-type MMTV integration site family member

XLF : XRCC4-like factor

XPF : Xeroderma pigmentosum group F-complementing protein

XRCC1 : X-ray Repair Cross Complementing protein 1

XRCC4 : X-ray Repair Cross Complementing protein 4

Xrs2 : DNA repair protein XRS2

AVANT-PROPOS

Le maintien de l'intégrité du génome est essentiel pour la transmission de l'information génétique au cours de la reproduction sexuée, pour promouvoir la survie cellulaire mais aussi pour prévenir l'émergence de cancers des cellules somatiques. La stabilité du génome est permise grâce à l'aide de nombreux garde-fous assurant la transmission correcte de l'information génétique d'une cellule mère aux cellules filles. Les contrôles dans la progression du cycle cellulaire, dans la réplication de l'ADN, dans la division cellulaire, ou encore la capacité des cellules à réparer l'ADN endommagé, sont autant de freins au développement tumoral. L'existence de multiples voies de la réparation de l'ADN qui sont essentielles à notre développement, et les mutations de nombreux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN qui sont associées avec des prédispositions à développer des cancers (Pour revue : Garber and Offit, 2005) est l'illustration directe de la nécessité de prévenir l'accumulation de l'instabilité génétique dans nos cellules.

Parmi, les nombreuses protéines impliquées dans la réparation des lésions de l'ADN, la famille des protéines PARPs, pour Poly(ADP-ribose) polymérases, joue un rôle majeur (Pour revue : Amé et al., 2004). Ces protéines interviennent dans de multiples processus cellulaires et leurs activités enzymatiques conduisent à l'ajout de monomères (MAR) ou de polymères d'ADP-ribose (PAR) sur leurs protéines cibles (Pour revue : Gupte et al., 2017; Schreiber et al., 2006). Les protéines PARP1 et PARP2 sont responsable de la synthèse de la quasi intégralité des PAR (Ame et al., 1999). Les fonctions diverses de ces protéines ont été étudiées par les deux laboratoires auquels j'ai été rattaché ainsi que par de nombreuses équipes de recherche dans le monde. En effet, les protéines PARP1 et PARP2 sont des cibles thérapeutiques d'intérêt dans de nombreux sous-types tumoraux.

L'un des premier rôles clés identifié pour la protéine PARP1, et peut-être PARP2, est d'assurer le recrutement de la protéine XRCC1 (X-Ray Repair Cross Complementing 1) au site de dommage de l'ADN (Hanzlikova et al., 2017; Masson et al., 1998b; Mortusewicz et al., 2007;

Schreiber et al., 2002). La protéine XRCC1 ne possède pas d'activité enzymatique mais joue un rôle de plateforme pour coordonner et favoriser toutes les étapes de la réparation des dommages de bases et des cassures simple-brin de l'ADN (CSB) (Pour revue : London, 2015). Le rôle de ces différentes protéines est donc essentiel pour préserver l'intégrité du génome.

Au cours de mon doctorat, j'ai développé deux axes de recherche :

Dans le premier axe j'ai analysé les fonctions spécifiques de la protéine PARP2 dans la réparation de l'ADN. Je me suis d'ailleurs particulièrement intéressé au rôle de PARP2 dans la prise en charge des cassures double-brins de l'ADN. J'ai pu mettre en évidence que PARP2 participe aux choix des voies de la réparation des cassures double-brins de l'ADN en limitant l'accumulation de la protéine 53BP1 (TP53-binding protein 1) aux sites de cassures de l'ADN, facilitant ainsi l'initiation de la résection des extrémités d'ADN.

Dans un second axe de recherche, j'ai déterminé l'implication de certaines modifications post-traductionnelles par phosphorylation, dans les fonctions de la protéine XRCC1 en réponse aux dommages de l'ADN. En effet, le laboratoire de recherche avait précédemment mis en évidence que la protéine CDK5 participe à la régulation du recrutement de la protéine XRCC1 en modulant l'activité PARP (Bolin et al., 2012). Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que l'interdomaine 1 de la protéine XRCC1 qui est phosphorylé par les CDKs, est déphosphorylé en réponse aux dommages de l'ADN induits par un agent alkylant, ce qui facilite son recrutement dépendant des PAR, aux sites de dommages à l'ADN.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 :
Le métabolisme de l'ADP-ribose

L'une des grandes complexités de l'étude du protéome vient de la diversité des modifications post-traductionnelles dont les protéines peuvent être la cible. Ces modifications peuvent réguler l'ensemble des fonctions protéiques en modifiant leurs localisations cellulaires, leurs partenaires, leurs abondances ou encore leurs activités enzymatiques. Comme les modifications post-traductionnelles peuvent être induites en réponse à des stimuli internes ou externes à la cellule et sont majoritairement réversibles, elles ne représentent pas un changement stable mais plutôt un état transitoire au cours de la demi-vie d'une protéine. Ainsi, pour chaque modification post-traductionnelle, il est possible de définir trois classes de protéines :

- Les « écrivains » sont les enzymes responsables de la modification de la protéine cible
- Les « lecteurs » sont les partenaires ou domaines protéiques capables d'interagir avec la forme modifiée de la protéine cible
- Les « gommeurs » sont en charge de l'enlèvement ou du recyclage de la modification

L'ADP-ribosylation est une modification post-traductionnelle des protéines dans laquelle une unité d'adénosine diphosphate-ribose (ADP-ribose), ou plusieurs sous-unités d'ADP-ribose provenant du Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD+) est transférée sur un substrat protéique. Lorsque un seul ADP-ribose est ajouté cette modification est nommée mono(ADP-ribose)ylation ou MARylation (MAR). Cette réaction est nommée Poly(ADP-ribose)ylation ou PARylation lorsqu'une chaine de sous-unité d'ADP-ribose (PAR) est greffée sur la première unité.

1. La PARylation

La synthèse de PAR a été détectée pour la première fois il y a plus de 55 ans dans des extraits protéique de foie de poule, par l'équipe dirigée par Paul Mandel (Chambon et al., 1963). Cette structure fortement semblable à de l'ARN, a été initialement confondu avec la queue d'adénine que l'on retrouve lors de la maturation des ARNs (queue Poly-A). En effet, il est facile d'observer que la composition du bio-polymère de PAR est proche de celle d'un acide nucléique expliquant cette confusion initiale (voir figure 1). Peu après, deux autres groupes de recherche, ont mis en évidence que la réaction de PARylation provenait du NAD+ et libérait une molécule de nicotinamide (Fujimura et al., 1967; Nishizuka et al., 1967, Figure1a). Il s'agissait bien de l'identification d'une nouvelle structure de polymère d'ADP-ribose car le produit de la réaction était résistant à l'action des DNAses, des RNAses et des protéases. La purification des PAR a permis de mettre en évidence que leurs longueurs variaient et pouvaient atteindre jusqu'à 200 unités d'ADP-ribose mais aussi contenir des points de branchement tous les 20 à 50 résidus (Alvarez-Gonzalez and Jacobson, 1987; Kiehlbauch et al., 1993; Tanaka et al., 1977, Figure1b). Rapidement, il a été identifié que la PARylation *in vivo* était un mécanisme transitoire avec la purification dès 1972 d'une protéine capable d'hydrolyser la liaison ribose-ribose située entre les sous-unité d'AD-ribose (Ueda et al., 1972). Cette protéine a été nommée PARG, pour Poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Ce n'est que cinq ans plus tard en 1977 que la première protéine capable de synthétiser les PAR a été purifiée (Okayama et al., 1977). Les fonctions multiples de cette protéine qui a été nommée PARP1, pour Poly(ADP-ribose) polymérase 1, seront développées dans la suite du manuscrit. Il faudra ensuite attendre dix ans pour que le gène de la protéine PARP1 soit cloné par plusieurs équipes de recherche (Alkhatib et al., 1987; Cherney et al., 1987; Suzuki et al., 1987; Uchida et al., 1987) et dix années supplémentaires pour que les premiers modèles animaux expérimentaux « Knockout » (KO) pour PARP1 soit développés (Agarwal et al., 1997; De Murcia et al., 1997a; Eliasson et al., 1997; Endres et al., 1997). Finalement, l'étude des cellules issues des souris KO pour PARP1 a mis en évidence que la synthèse des PAR n'était pas totalement abolie dans ces cellules (Shieh et al., 1998a). Cette observation a permis de mettre en évidence d'autres protéines capables de réaliser la synthèse de PAR dont la protéine PARP2 et la protéine PARP5 ou Tankyrase (Ame et al., 1999; Berghammer et al., 1999; Johansson, 1999; Kickhoefer et al., 1999b; Smith et al., 1998). Ces protéines font partie d'une famille de 17 protéines qui ont été identifiées

sur la base de l'homologie de leurs sites catalytiques avec celui de PARP1, et leurs rôles respectifs seront abordés par la suite. On sait maintenant que seules 4 protéines (PARP1, PARP2, PARP5a, PARP5b) sont capables de catalyser la synthèse de PAR en hydrolysant le NAD+ *in vitro* (Vyas et al., 2014). PARP3 et PARP4 pourraient aussi posséder cette capacité *in vivo* (Boehler et al., 2011b; Kickhoefer et al., 1999b).

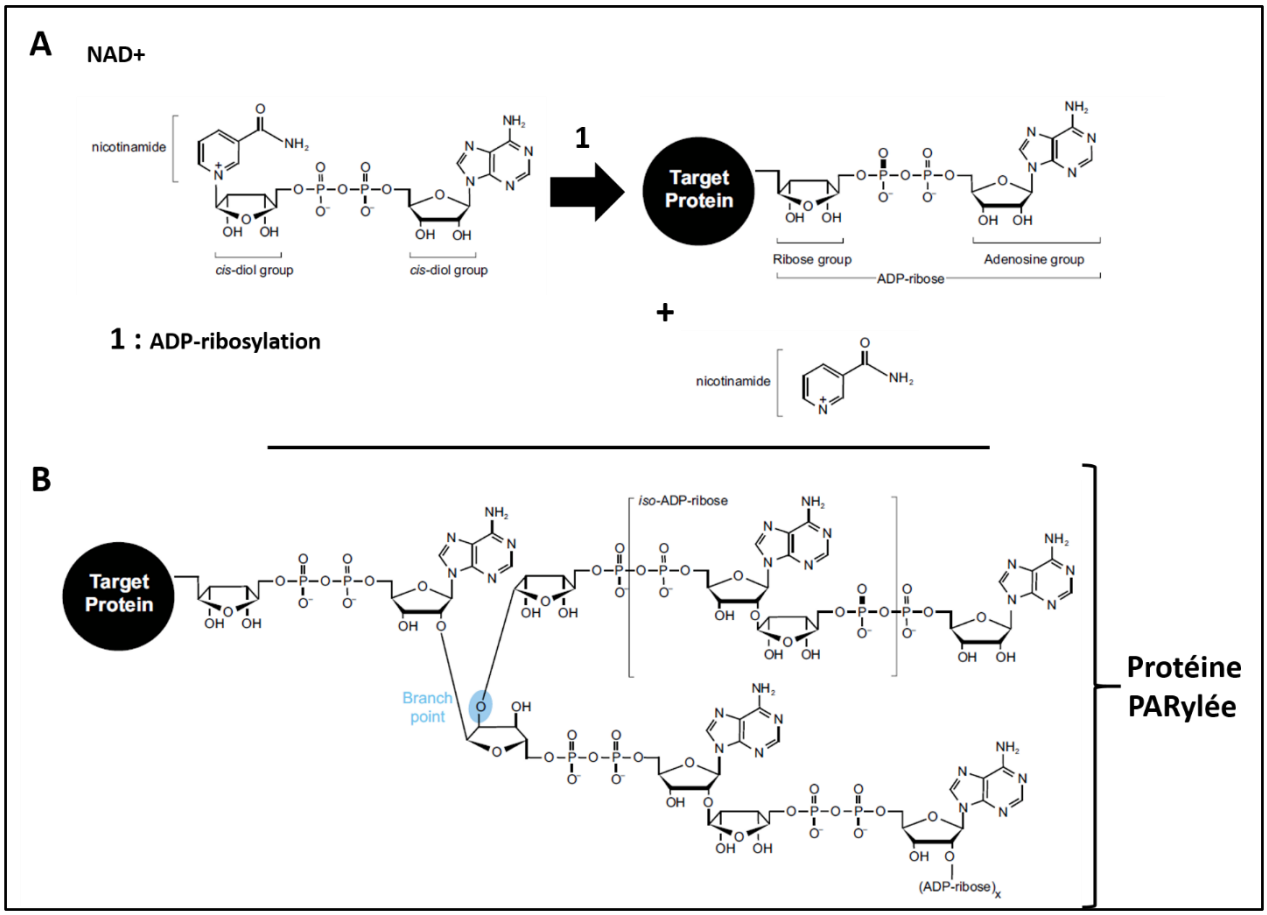


Figure 1 : La réaction d'ADP-ribosylation. (**A**) La réaction d'ADP-ribosylation consiste en l'hydrolyse du NAD+ en une sous-unité d'ADP-ribose et en une molécule de nicotinamide. La sous-unité d'ADP-ribose est ensuite transférée sur la protéine cible via une liaison glycosidique grâce à l'énergie produite lors de l'hydrolyse du NAD+. (**B**) La PARylation se déroule lorsque plusieurs sous-unités d'ADP-ribose sont polymérisées sur la première. Cette réaction induit la formation de polymères d'ADP-riboses reliés entre eux par des liaisons ribose-ribose. La plus petite sous-unité structurelle des PAR est nommée iso-ADP-ribose. Des branchements peuvent aussi exister tout au long de l'homopolymère de PAR. (Figure adaptée de Vivelo and Leung, 2015)

L'ADP-ribosylation est conservée des virus à l'homme, à l'exception de la levure. On retrouve en effet des protéines homologues avec le domaine catalytique de la PARP1 dans les domaines du monde animal, des plantes, des champignons et des protistes mais aussi chez les procaryotes et les virus (Otto et al., 2005; Perina et al., 2014). Ces protéines très bien conservées au cours de l'évolution sont également homologues de toxines que l'on retrouve dans certaines bactéries pathogènes.

Au niveau des protéines cibles, les PAR sont essentiellement attachés de façon covalente sur des acides aminés chargés. Ainsi, les résidus glutamate (Burzio et al., 1979; Riquelme et al., 1979; Zhang et al., 2013a), aspartate (Suzuki et al., 1987; Zhang et al., 2013a), arginine (Vandekerckhove et al., 1987) ainsi que lysine (Martello et al., 2016a; Messner et al., 2010) peuvent tous être PARylés. Récemment, une étude a montré que les sérines pouvaient être modifiées par les PAR (Leidecker et al., 2016). De manière intéressante, la capacité de PARP1 et de PARP2 à PARyler les sérines nécessite la formation d'un hétéro-complexe avec la protéine HPF1 (Bonfiglio et al., 2017). Cette information laisse supposer qu'il puisse exister de multiples sous complexes contenant les protéines PARP1 et PARP2, chacun ayant une spécificité pour des substrats différents. Ceci pourrait expliquer comment les PARPs peuvent assurer leurs multiples fonctions dans nos cellules. Nous reviendrons sur ces fonctions dans la section suivante.

Au niveau fonctionnel, les conséquences directes de la PARylation d'une protéine cible sont encore en cours d'investigation. Tout d'abord, il a été difficile pendant longtemps d'identifier les cibles des PARPs et encore plus difficile de déterminer quels acides aminés pouvaient être modifiés. Ainsi, la majeure partie des connaissances dont nous disposons vient de l'analyse des phénotypes associés à l'absence de l'une ou de l'autre des protéines PARPs dans des organismes modèles ou dans des lignées cellulaires. Pourtant, ces dernières années, plusieurs équipes de recherches ont réussi à identifier un grand nombre de substrats des protéines PARPs par des approches de spectrométrie de masse combinées avec l'utilisation d'anticorps capables de reconnaitre les PAR, de domaines protéiques reconnaissant les PAR ou encore d'analogue du NAD+ pour isoler les protéines modifiées (Carter-O'Connell and Cohen, 2015; Carter-O'Connell et al., 2014; Chiou et al., 2012; Daniels et al., 2014; Gagne et al., 2008; Gagne et al., 2012; Gibson et al., 2016; Isabelle et al., 2012; Isabelle et al., 2010; Jungmichel et al., 2013a; Zhang et al., 2013a). Même si ces études diffèrent largement quant à leurs méthodologies, elles ont permis de déterminer

que probablement plusieurs centaines de protéines pouvaient être directement PARylées. Parmi ces protéines, on retrouve de nombreux facteurs de la réparation, des remodeleurs de la chromatine, des facteurs de transcription, des régulateurs du cycle cellulaire ou encore des protéines de liaison à l'ARN, soulignant l'impact de la PARylation sur de nombreuses voies du métabolisme cellulaire.

Néanmoins, il faudra attendre la réalisation d'études fonctionnelles utilisant de la mutagénèse dirigée pour comprendre l'importance globale de tout ce réseau de modifications. En effet, la greffe de PAR sur une protéine cible peut avoir de multiples conséquences. Par exemple, la structure des PAR étant proche de celle d'un acide nucléique, celle-ci est fortement chargée négativement et peut donc modifier drastiquement les propriétés de la protéine cible.

2. La MARylation

Les premières évidences de l'ajout d'une unique sous-unité d'ADP-ribose sur une protéine cible ont été obtenues chez certaines bactéries pathogènes (Gill et al., 1969; Honjo et al., 1968). En effet, certaines toxines sécrétées par des bactéries comme *Corynebacterium diphtheriae, Bordetella pertussis, Vibrio choleræ, Clostridium botulinum* ou encore *Escherichia coli* sont capables de mono(ADP-ribose)yler certaines protéines cibles de la cellule hôte (Pour revue : Krueger and Barbieri, 1995 et tableau 1).

La MARylation participe donc directement à la pathogénicité de ces bactéries. Par exemple, la MARylation du facteur d'élongation 2 inhibe la synthèse protéique et celle de la protéine Rho, perturbe les filaments d'actine et l'appareil de Golgi (voir tableau 1 pour un résumé des cibles des toxines bactériennes par MARylation).

On retrouve aussi des complexes protéiques capable de MARyler des protéines cibles au sein des mécanismes de pathogénicité de certains bactériophages (UCHIDA et al., 1971). Chez les mammifères, on retrouve aussi plusieurs classes de protéines capables de MARylation. On retrouve ainsi la majorité des membres de la famille des PARPs ainsi que les protéines de la famille des sirtuines dont les fonctions seront détaillées ci-dessous. Le rôle des MAR dans l'organisme est encore plus obscur que celui des PAR et on ne connait que peu de protéines ciblées par cette modification. En effet, la détection des MAR est encore plus difficile que celle des PAR. Pourtant,

il semblerait qu'il y ait jusqu'à 700 fois plus de résidus mono(ADP-ribose)ylés que de résidus poly(ADP-ribose)ylés (BREDEHORST et al., 1981; Jacobson et al., 1984; WIELCKENS et al., 1981). Le rôle fonctionnel de cette modification reste donc un vaste champ d'étude et sera brièvement discuté lorsque j'aborderai les fonctions de la famille des PARPs et des sirtuines (Pour revue : Di Girolamo et al., 2005).

Tableau 1 : Effet de la MARylation des toxines bactériennes sur les cellules hôtes (Tableau adapté de Corda and Di Girolamo, 2003)

Enzymes	Source	Substrat/Acide aminé	Effet
Diphtheria	*Corynebacterium diphtheriae*	EF-2/diphtamide715	Inhibe la synthèse protéique
Exotoxin A	*Pseudomonas aeruginosa*	EF-2/diphtamide715	Inhibe la synthèse protéique
Exotoxin S	*Pseudomonas aeruginosa*	Ras family/Arg41	Perturbe les filaments d'actine
Cholera	*Vibrio cholerae*	$G\alpha_s$, $G\alpha_t$/Arg187	Inhibe l'activité GTPase
LT1, LT2	*Escherichia coli*	$G\alpha_s$, $G\alpha_t$/Arg187	Inhibe l'activité GTPase
Pertussis	*Bordetella pertussis*	$G\alpha_i$, $G\alpha_o$, $G\alpha_t$/Cys351	Découple la protéine G de son récepteur
C2,iota t	*Clostridium botulinum*	Actine	Inhibe la polymérisation de l'actine
C3	*Clostridium botulinum*	Rho, Rac/Asn41	Perturbe les filaments d'actine
C3-like	*Clostridium limosum*	Rho, Rac/Asn41	Perturbe les filaments d'actine
EDIN	*Staphylococcus aureus*	Rho/Asn41	Perturbe le Golgi
VIP2	*Bacillus cereus*	Rho/Asn41	Perturbe les filaments d'actine
SpvB	*Salmonella enterica*	Actine	Inhibe la polymérisation de l'actine

3. Les écrivains

3.1 La famille des PARPs

Comme je l'ai mentionné précédemment, la famille des protéines PARPs est constituée de 17 protéines. Ces protéines ont été identifiées sur la base de l'homologie de leur domaine catalytique avec celui de la protéine PARP1 (voir figure 2). Ce domaine est situé dans la partie C-terminale (à l'exception de PARP4) et confère l'activité de ces protéines s'il est fonctionnel. De par leur activité (PARylation ou MARylation), les PARPs remplissent de nombreuses fonctions dans la cellule. En fonction de leurs différents domaines, les familles des PARPs a été sub-dividée en quatre sous-familles.

3.1.1 Les PARPs dépendantes de l'ADN

Ce sous-groupe de la famille des PARPs comprend les trois protéines nucléaires PARP1, PARP2 et PARP3. Ces trois PARPs ont été définies comme dépendantes de l'ADN puisque leur activité est considérablement stimulée lors de l'interaction à l'ADN de leur domaine d'interaction avec des dommages de l'ADN. Ces trois protéines partagent un domaine catalytique et deux domaines WGR (Tryptophane-Glycine-Arginine) dans leur partie C-terminale. En revanche, leur domaine de liaison à l'ADN situé dans la partie N-terminale, n'est pas conservé entre ces protéines (voir figure 3). Cette différence explique certaines des spécificités de ces protéines envers des structures de l'ADN (Kutuzov et al., 2013a; Langelier et al., 2014a; Obaji et al., 2016; Sukhanova et al., 2016).

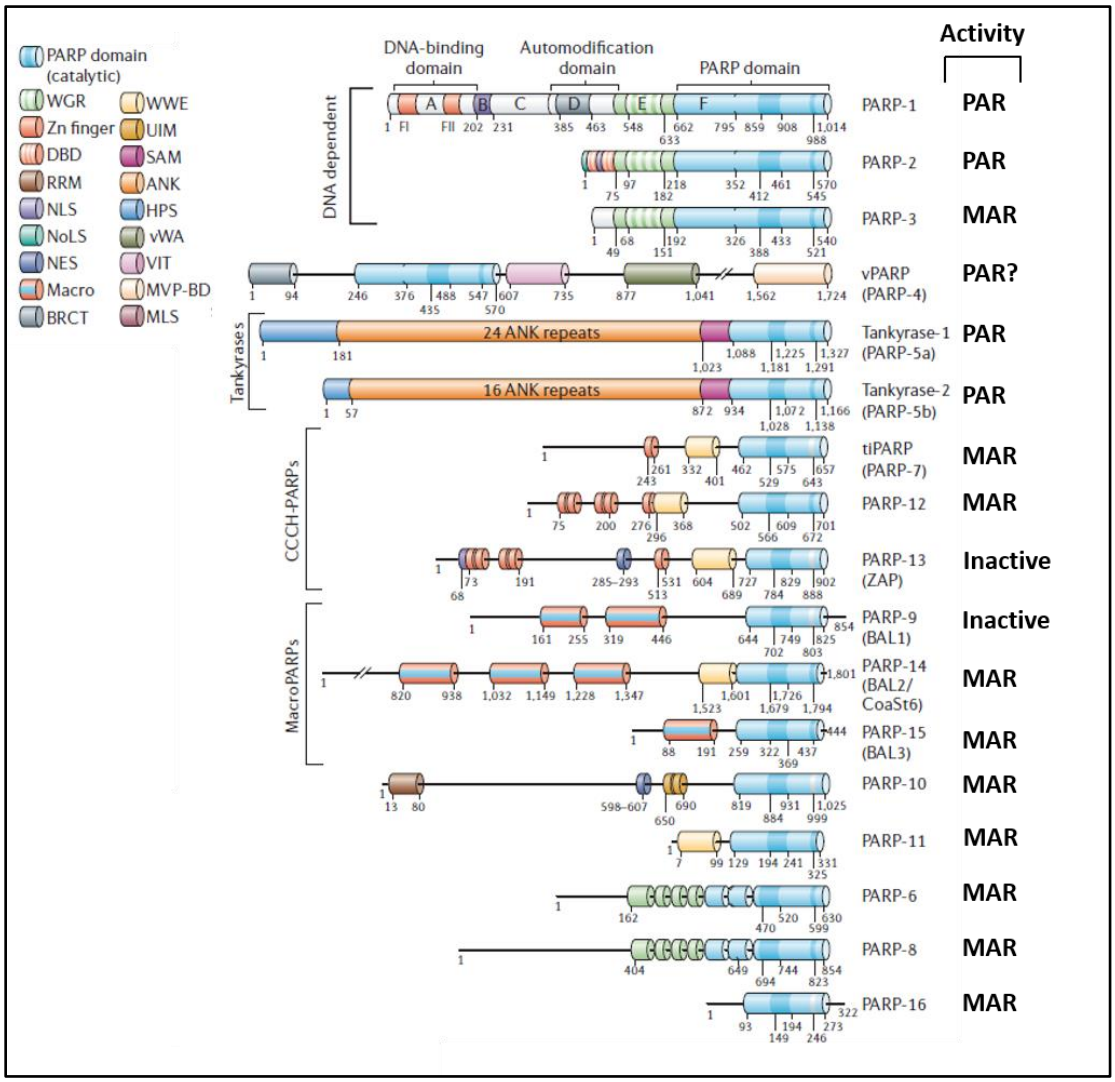


Figure 2 : La famille des PARPs. Les domaines fonctionnels de chaque protéine sont colorés et légendés en haut à gauche. Au sein des domaines PARPs (colorés en bleu ciel dans la partie C-terminale des protéines PARPs, à l'exception de PARP4), les régions d'homologies correspondantes à la signature PARP définies sur la base de la protéine PARP1 sont foncées. ANK : Ankyrin; BRCT : BRCA1 C-terminal; DBM : DNA-binding domain; HPS : Homopolymeric runs of His, Pro and Ser; MVP-BD : MVP-binding domain; RRM : RNA-binding motif; SAM, Sterile α-motif; UIM : Ubiquitin-interacting motif; VIT : Vault inter-α-trypsin; vWA : von Willebrand factor type A; WGR : Conserved W, G and R residues; WWE : Conserved W, W and E residues; MLS, Mitochondrial localization signal; NES, Nuclear export signal; NoLS, Nucleolar localization signal; NLS, nuclear localization signal (Figure adaptée de Schreiber et al., 2006).

PARP1 est une protéine de 116 kDa et possède trois domaines à doigt de zinc (Zn) dans sa partie N-terminale qui lui permettent de lier l'ADN (voir figure 3). Les deux premiers Zn1 et Zn2 permettent la reconnaissance des cassures de l'ADN ce qui stimule l'activité de PARP1 de plus de 500 fois (Eustermann et al., 2011; Langelier et al., 2011; Lonskaya et al., 2005; Pion et al., 2003).

Le troisième Zn3 est essentiel pour la liaison à l'ADN et va transmettre une modification de la position relative du domaine WGR et du domaine catalytique de la protéine ce qui va stimuler son activité (Langelier et al., 2010; Tao et al., 2008).

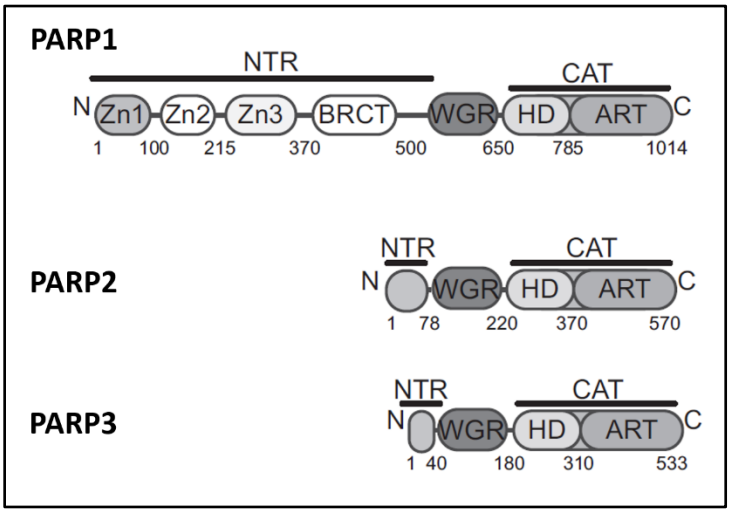


Figure 3 : Les différents domaines des protéines PARP1, PARP2 et PARP3 (Figure adaptée de Langelier et al., 2014a). Cette figure montre la conservation du domaine catalytique (CAT) qui est constitué d'un domaine hélicoïdal régulateur (HD) et du site porteur de l'activité (ARD), ainsi que du domaine WGR. La région N-terminale (NTR) de ces trois protéines n'est pas conservée. En plus des trois domaines à doigts de zinc (Zn1-3), PARP1 possède aussi un domaine BRCT (BRCA1 C-terminal) qui est la région d'automodification de l'enzyme.

Les protéines PARP2 (65 kDa) et PARP3 (63 kDa) possèdent un domaine N-terminal bien plus restreint en comparaison. Il s'agit d'une région de 78 résidus et de seulement 40 résidus au sein des protéines PARP2 et PARP3 respectivement (voir Figure 3). Ces domaines semblent être déstructurés (Riccio et al., 2016). Pour PARP2, il a été postulé que cette région fasse office de domaine de liaison à l'ADN car l'homologue de PARP2 chez *Arabidopsis thaliana* semble présenter un domaine de reconnaissance de l'ADN de type domaine SAP (Aravind and Koonin, 2000). Chez l'homme, il été finalement montré que le domaine N-terminal se lie bien à l'ADN mais ce sont les domaines WGR et catalytique qui assurent la reconnaissance de l'ADN endommagé, le recrutement aux sites de dommages de l'ADN et l'activation de PARP2 (Obaji et al., 2016; Riccio et al., 2016). Le mécanisme de reconnaissance de l'ADN et d'activation de PARP3 n'est pas encore caractérisé à ce jour mais pourrait être similaire à celui de PARP2. Ainsi, les trois protéines PARP1, PARP2 et PARP3 bien que recrutées aux sites de dommages de l'ADN, seront

activées par des dommages de structures différentes (Boehler et al., 2011a; Mortusewicz et al., 2007). En effet, l'activité de PARP1 est majoritairement induite par les cassures de l'ADN (simple et double-brins), alors que PARP2 semble préférentiellement être activé par des intermédiaires de réparation comme les « gaps » ou les « flaps » (Eustermann et al., 2011; Kutuzov et al., 2013b; Langelier et al., 2011; Langelier et al., 2014a; Obaji et al., 2016; Sukhanova et al., 2016). De façon intriguante, PARP2 pourrait aussi être activé par l'ARN (Léger et al., 2014). Finalement, il semblerait que des dommages contenant une extrémité 5'phosphate et les « nicks » soient les activateurs de choix de PARP3 (Grundy et al., 2016; Langelier et al., 2014a). Ces différences dans la reconnaissance des structures d'ADN endommagées pourraient être à l'origine des cinétiques de recrutement et de dissociation aux sites de dommages différentes pour ces trois protéines. En effet, les protéines PARP2 et PARP3 persistent plus longtemps aux sites de dommages de l'ADN que la protéine PARP1 (Boehler et al., 2011a; Mortusewicz et al., 2007).

Néanmoins, malgré ces différences, l'activation de PARP1 ou de PARP2 conduit de façon semblable à la synthèse de PAR. PARP1 semble responsable, en fonction du type cellulaire, de 80 à 95% de la synthèse totale des PAR en réponse aux dommages de l'ADN alors que PARP2 catalyse la synthèse des autres 5 à 20% (Ame et al., 1999). Cette différence dans le niveau relatif de synthèse des PAR pourrait également contribuer à la différence de cinétiques de recrutement et de dissociation aux sites de dommages des PARPs.

En revanche, l'action de PARP3 comme PARylase (Boehler et al., 2011b; Rulten et al., 2011) ou MARylase (Grundy et al., 2016; Loseva et al., 2010a; Vyas et al., 2014) reste à ce jour débattue. Pourtant, le site catalytique de PARP3 possède la signature PARP H-Y-E (Histidine-Tyrosine-Glutamate) nécessaire pour la synthèse de PAR. En effet, au sein du site catalytique des PARPs dépendante de l'ADN mais aussi des tankyrases, les résidus histidine et tyrosine interagissent avec le groupement ribose du NAD+ pour le placer dans une conformation permettant la réaction d'ADP-ribosylation. Le résidu glutamate est lui nécessaire à l'ajout d'une sous-unité supplémentaire d'ADP-ribose et donc à la réaction de polymérisation (Kleine et al., 2008; Vyas et al., 2014). Néanmoins, l'activité PARP dépend aussi de la structure et de la rigidité de deux boucles protéiques, la boucle donneuse (D-loop) qui interagit avec le NAD+ et la boucle acceptrice (A-loop) qui interagit avec l'ADP-ribose et avec le substrat protéique (Ruf et al., 1998b). L'absence

de synthèse de PAR de PARP3 pourrait ainsi provenir de la moins bonne conservation de la structure de la D-loop.

Le recrutement et l'activation successive de PARP1, PARP2 et PARP3 est essentiel pour coordonner les étapes de la réparation de l'ADN à de nombreux niveaux. Leurs activations par des structures spécifiques de l'ADN, leurs offrent ainsi chacune des rôles respectifs non redondants. Les fonctions de ces trois protéines au cours de la réparation de l'ADN seront abordées dans la seconde partie de l'introduction, lorsque les mécanismes de la réparation seront abordés.

3.1.2 Les Tankyrases

La sous-famille des tankyrases est constituée de la tankyrase 1 ou PARP5a et de la tankyrase 2 (ou PARP5b). Ces protéines sont caractérisées par un domaine ankyrin composés de 24 répétitions de 33 résidus (répétition ANK, voir Figure 2). Chaque répétition forme un domaine composé de deux hélices alpha séparées par une boucle. Ce domaine, permettant des interactions protéine-protéine, est extrêmement bien conservé au cours de l'évolution et se retrouve dans tous les domaines du vivant (Pour revue : Mosavi et al., 2004). La tankyrase 1 présente en plus de la tankyrase 2, un domaine HPS (Histidine-Proline-Serine) en N-terminal dont la fonction reste à déterminer.

La tankyrase 1 a été découverte comme étant un facteur régulant l'homéostasie des télomères en modifiant la protéine TRF1 par PARylation (Smith et al., 1998). Trois ans plus tard, la tankyrase 2 a été identifiée dans un crible de double-hybride en interaction avec TRF1 (Kaminker et al., 2001). La fonction majeure de la tankyrase 1 est d'inhiber l'action de la protéine TRF1 aux télomères. Comme TRF1 joue un rôle de régulation négative sur la longueur des télomères, la tankyrase 1 facilite donc l'élongation des télomères (Smith and de Lange, 2000). La tankyrase 1 stabilise aussi le fuseau mitotique et facilite la cohésion des chromatides sœurs en complexe avec la protéine NuMa (Chang et al., 2005). Finalement, il a été observé que la tankyrase 1 pouvait cibler et diminuer la stabilité l'Axine, une protéine centrale dans la régulation négative de la voie Wnt (Wingless-type MMTV integration site family member). Ainsi, l'inhibition des tankyrases, en augmentant la stabilité de l'axine, diminue l'activité de la voie Wnt. La voie Wnt étant suractivée

dans de nombreux cancers et favorisant la prolifération des cellules tumorales, les tankyrases pourraient donc être des cibles thérapeutiques intéressantes pour diminuer la prolifération tumorale des cancers dépendants de l'activation de la voie Wnt (Huang et al., 2009; Karner et al., 2010; Martino-Echarri et al., 2016; Riffell et al., 2012). De façon intéressante, plusieurs inhibiteurs de PARP, dont l'importance sera discutée dans la suite du manuscrit (voir page 118), en développement ou déjà utilisés en clinique, présentent une affinité non négligeable pour les tankyrases (Haikarainen et al., 2014; Wahlberg et al., 2012). Il serait ainsi intéressant d'étudier si ces molécules peuvent bénéficier aux patients dont les tumeurs prolifèrent via une sur-activation de la voie Wnt.

3.1.3 Les PARPs à doigt de zinc CCCH

La famille des PARPs à doigt de zinc de type CCCH comprend les trois protéines PARP7 (tiPARP), PARP12 et PARP13 (voir figure 2). Le domaine CCCH (pour Cystidine-Cystidine-Cystidine-Histidine) forme un domaine à doigt de zinc qui a pour particularité de favoriser la liaison à l'ARN (Hall, 2005). Les deux protéines PARP7 et PARP12 sont des mono(ADP-ribose)ylases alors que PARP13 semble inactive. En effet, il a été observé par cristallographie à rayon X que le site catalytique de PARP13 adopte une conformation fermée ne permettant pas la liaison au NAD+ (Karlberg et al., 2015). Néanmoins, PARP13 régule l'expression de nombreux gènes via sa capacité de déstabilisation des ARNm sur lesquels elle se lie. Ainsi, PARP13 joue un rôle antiviral en déstabilisant les ARNm viraux (Bick et al., 2003; Guo et al., 2007; Zhu et al., 2011) et a aussi un rôle pro-apoptotique en déstabilisant le transcrit du gène *trailr4* (Todorova et al., 2014). PARP7 et PARP12 semblent aussi participer à la réponse antivirale en régulant négativement l'expression des gènes viraux (Atasheva et al., 2014). De façon intéressante, l'expression de PARP7 est aussi induite par le récepteur ARH (pour aryl hydrocarbon receptor) en réponse à l'exposition aux dioxines comme le TCCP (Ma et al., 2001). L'induction de l'expression et de l'activité de PARP7 (ou TiPARP pour TCCP inducible PARP) en réponse aux dioxines est importante pour assurer la survie chez la souris, néanmoins le mécanisme précis de son action protectrice n'est pas encore bien caractérisé (Ahmed et al., 2015).

3.1.4 Les PARPs contenant un macrodomaine ou macroPARPs

Les macrodomaines sont des domaines permettant la liaison aux PAR ou aux MAR et peuvent être porteurs d'une activité catalytique (Hassler et al., 2011; Karras et al., 2005; Rack et al., 2016; Rosenthal et al., 2013; Timinszky et al., 2009a). Ils seront décrit ultérieurement (voir page 39 et 45). Les macroPARPs (PARP9, PARP14 et PARP15) sont définies ainsi par la présence d'un ou plusieurs macrodomaines dans leur partie N-terminale (voir figure 2 PARP14 et PARP15 sont des mono(ADP-ribose)ylases alors que PARP9 semble inactive *in vitro* (Vyas et al., 2014). Ces trois protéines semblent être essentiellement impliquées dans la régulation de la transcription en tant que cofacteurs. PARP9 pourrait avoir un rôle de répresseur de la transcription (Aguiar et al., 2005) alors que PARP14 active le programme transcriptionnel dépendant de STAT6 (pour signal transducer and activator of transcription 6) (Goenka and Boothby, 2006). L'expression de PARP9 pourrait aussi favoriser la progression tumorale des lymphomes B dans lesquels on retrouve souvent sa surexpression (Aguiar et al., 2005). Néanmoins son expression n'est pas nécessaire chez la souris pour la réparation des cassures double-brins de l'ADN, la recombinaison VDJ ou pendant la réaction de CSR (Robert et al., 2017).

3.1.5 Les PARPs non classifiées

Ces protéines ne forment pas un groupe distinct en soit mais sont regroupées dans cette section car elles ne possèdent pas les caractéristiques distinctes abordées ci-dessus. Sont regroupés ici les PARP4, PARP6, PARP8, PARP10 et PARP11 et PARP16 (voir figure 2).

- PARP4 est une large protéine de 193kDa et fait partie intégrante d'un large complexe ribonucléoprotéique nommé « vault ». Ce complexe est présent dans le cytoplasme et est très bien conservé. Il semble jouer un rôle dans la résistance tumorale aux agents génotoxiques et dans le transport intracellulaire (Kickhoefer et al., 1999a). *In vitro,* PARP4 peut uniquement synthétiser des MAR, mais *in cellulo*, il est possible que certaines interactions, dont sa présence au sein du « vault », lui confère une capacité de PARylation (Kickhoefer et al., 1999a; Vyas et al., 2014). PARP4 est aussi présent au sein du noyau et au niveau du fuseau mitotique et des télomères. Néanmoins, les souris KO pour PARP4

sont viables et ne présentent aucun des phénotypes associés à la déficience du « vault ». Ces souris présentent cependant une incidence plus importante de formation de cancers du côlon induits par des carcinogènes, suggérant un rôle dans la réponse aux dommages de l'ADN (Raval-Fernandes et al., 2005).

- PARP6 semble jouer un rôle de suppresseur de tumeur en inhibant la progression dans le cycle cellulaire et en facilitant l'induction de l'apoptose dans les cellules de cancers colorectaux *in vitro* et *in vivo* (Qi et al., 2016; Tuncel et al., 2012).
- PARP10 est une MARylase qui possède un domaine d'interaction à l'ubiquitine et qui contribue à la régulation de la transcription par la voie NF-κB (NF-nuclear factor-kappa B) (Verheugd et al., 2013). PARP10 est aussi un partenaire de l'oncoprotéine C-myc et semble inhiber son activité transcriptionnelle indépendamment de son activité catalytique (Yu et al., 2005). PARP10 semble aussi participer directement à la réponse aux dommages de l'ADN. En effet, via une interaction avec la protéine PCNA, PARP10 semble faciliter la synthèse d'ADN translésionnelle qui est une voie essentielle dans la tolérance aux dommages de l'ADN (Nicolae et al., 2014). De plus, une mutation homozygote de PARP10 (c.648delAG) a été identifiée chez un patient souffrant de syndrome neurodégénératif. Les cellules issues de ce patient étaient aussi beaucoup plus sensibles à des agents génotoxiques comme les UV ou l'hydroxyurée laissant indiquer un rôle important de PARP10 dans la résistance aux dommages de l'ADN (Shahrour et al., 2016).
- Le rôle de PARP11 a été très peu étudié. La seule information disponible indique que l'activité de PARP11 pourrait faciliter la différenciation des spermatozoïdes chez la souris (Meyer-Ficca et al., 2015).
- PARP16 est une protéine ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique. PARP16 MARyle deux kinases senseurs de stress au niveau du réticulum endoplasmique (PERK, IRE1α) et stimule leurs activités pour transmettre le signal de stress lors de la détection d'un mauvais repliement des protéines (Jwa and Chang, 2012).
- Finalement, les fonctions de PARP8 n'ont pas été caractérisées à ce jour

Ainsi, même si la famille des PARPs partage un domaine catalytique fortement conservé, les fonctions de ces protéines sont multiples et non redondantes. Cependant, la majorité de ces fonctions semblent être stimulées en réponse à un stress exogène ou endogène. L'étude des

mécanismes régulant l'activation de ces enzymes est donc essentielle à la compréhension de leurs fonctions variées.

3.2 Les sirtuines

Les rôles des sirtuines au travers de leur fonction de déacétylation ont été largement étudiés. (Pour revue : Chalkiadaki and Guarente, 2015; Kupis et al., 2016). Il a aussi été montré que les sirtuines possèdent la capacité d'ajouter un MAR sur leur cible de façon indépendante de leur activité de déacétylation (Frye, 1999; Imai et al., 2000; Tanny et al., 1999).

La famille des sirtuines est composée de sept protéines (SIRT1-7), homologues de Sir2p chez la levure (Pour revue : Blander and Guarente, 2004). Cette famille de protéines est bien caractérisée pour son activité de déacétylation des histones en utilisant le NAD+ comme cofacteur. Les sirtuines sont donc des consommateurs de NAD+ et jouent un rôle crucial dans la prévention de nombreuses pathologies comme le vieillissement, les maladies neurodégénératives, le diabète, les maladies cardiovasculaires ou encore les cancers. Pour l'instant, seuls deux substrats de MARylation des sirtuines ont été identifiés chez les mammifères. Dans les cellules béta du pancréas, SIRT4 MARyle la protéine glutamate deshydrogénase ce qui diminue son activité. En conséquence, la production d'insuline sera réduite (Haigis et al., 2006). SIRT6 mono(ADP-ribose)yl la lysine 521 de PARP1 en réponse à l'induction de dommage de l'ADN. Ceci stimule l'activité de PARP1 et facilite la réparation des dommages de l'ADN (Mao et al., 2011). Ainsi, même si les rôles de la fonction de déacétylation des sirtuines ont été très largement étudiés, il reste beaucoup à comprendre concernant l'importance de l'activité de MARylation des sirtuines. Il est aussi important de noter que certains petits inhibiteurs de PARP de première génération ont probablement une affinité non négligeable pour les sirtuines du fait de la présence d'un domaine d'hydrolyse du NAD+ chez les sirtuines.

4. Les lecteurs

En réponse à l'activation d'une protéine PARP, les modifications post-traductionnelles induites permettent de recruter localement de nombreuses protéines via des modules de reconnaissances des PAR ou des MAR. Cette réponse permet une accumulation locale et rapide de très nombreuses protéines et favorise les interactions protéine-protéine ultérieures. Il s'agit pour certains de domaines protéiques bien structurés et caractérisés, alors que d'autres sont des séquences désordonnées moins bien caractérisées. Dans cette partie, je détaillerai les principaux modules permettant la reconnaissance des PAR (et des MAR pour certains) et qui sont à ce titre, les lecteurs de l'ADP-ribose (Pour revue : Gibson and Kraus, 2012b; Kalisch et al., 2012).

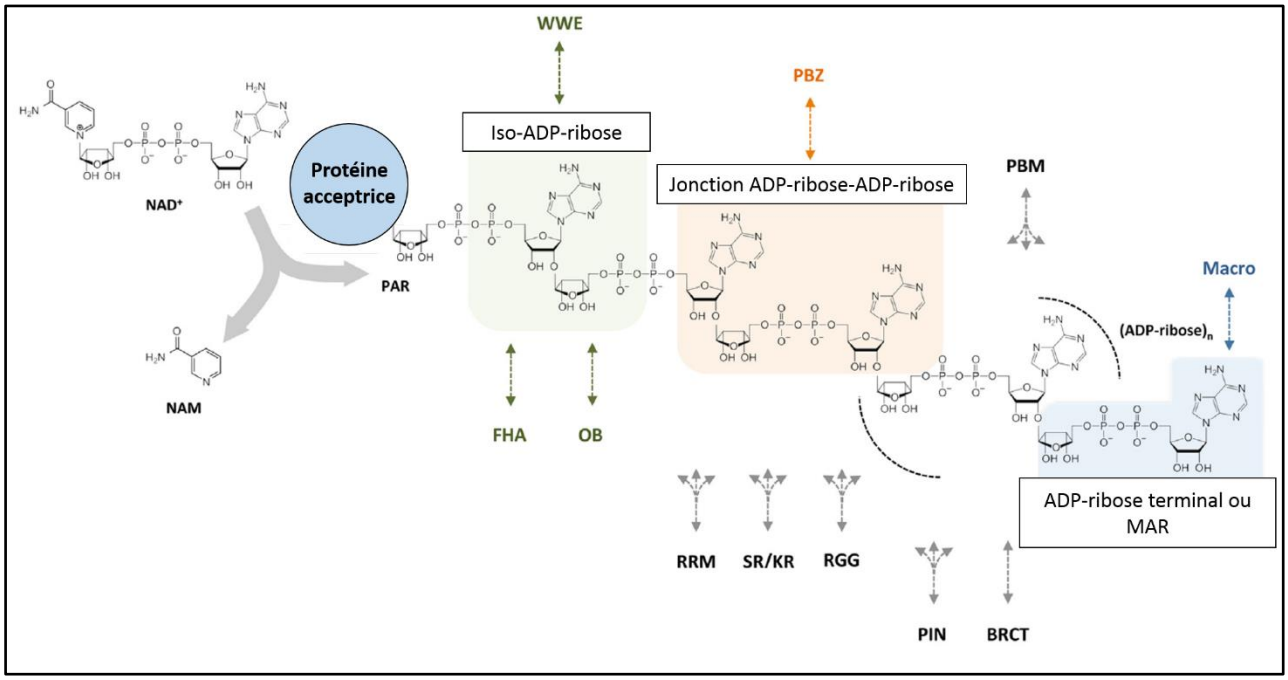


Figure 4 : Les différents modules de reconnaissance de l'ADP-ribose. En réponse à l'ajout de PAR sur une protéine cible par une PARP, quatre principaux modules permettent leur reconnaissance (WWE, PBZ, PBM, macrodomaine). D'autres motifs précédemment connus pour permettre des interactions avec l'ARN (RRM, SK/KR, RGG), avec l'ADN simple-brin (OB, PIN) ou avec des phosphorylations (FHA, BRCT) sont aussi capables de médier une interaction avec les PAR. WWE : Conserved W, W and E residues, PBZ : PAR-binding zinc finger, PBM : PAR-binding motif, FHA : Forkhead associated, OB : oligonucleotide/oligosaccharide-binding, RRM : RNA-binding motif, BRCT : BRCA1 C-terminal, SK/KR : Serine/lysine-arginine repeat, PIN : PilT N-terminus. Les flèches multiples indiquent que le mécanisme de reconnaissance des PAR n'est pas connu (Figure adaptée de Teloni and Altmeyer, 2016).

4.1 Le motif PBM

La première protéine identifiée comme ayant un motif PBM (pour PAR-binding motif) d'interaction non-covalente avec les PAR est le suppresseur de tumeur P53 (Malanga et al., 1998). Le motif PBM a été caractérisé en 2000 et consiste en deux régions conservées. La première région contient des acides aminés basiques et la seconde contient des acides aminés hydrophobes mais entrecoupés de résidus basiques (Figure 5, Pleschke et al., 2000b). D'après une analyse bio-informatique, il semblerait que ce motif puisse être retrouvé dans plus de 800 protéines. Parmi les protéines contenant ce motif, on retrouve les protéines XRCC1, DNA Ligase III, ATM, Ku70, MSH6 ou encore P53 (Gagne et al., 2008). Le mécanisme précis d'interaction avec les PAR de ce motif n'est pas connu mais semble être dépendant de la longueur de la chaine de PAR et permet une forte interaction de l'ordre du sub-micromolaire voire du sub-nanomolaire (Fahrer et al., 2007; Fahrer et al., 2010).

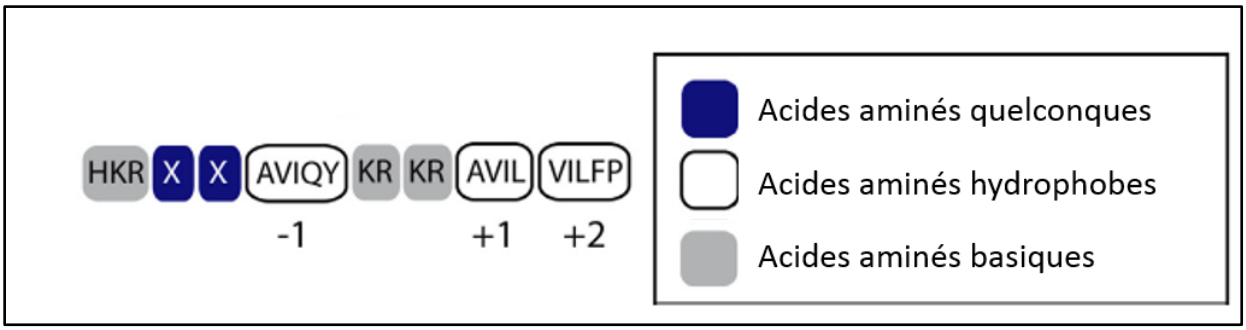


Figure 5 : Le domaine PBM. Cet alignement représente le domaine minimal de reconnaissance des PAR. La répétition interne lysine/arginine (KR) est essentielle pour la reconnaissance des PAR. Il y a aussi une préférence pour des acides aminés hydrophobes en position -1, +1 et +2. Les acides aminés basiques en N-terminal du motif ne sont pas complètement essentiels à la reconnaissance des PAR. (Figure adaptée de Krietsch et al., 2013)

4.2 Le motif PBZ

Le motif PBZ (pour PAR-binding zinc finger) a été identifié en 2008 et n'a été à ce jour observé que dans les deux protéines APLF (Aprataxin and PNK-like factor) et CHFR (Checkpoint with forkhead and ring finger domains) (Ahel et al., 2008). Un domaine similaire contenant des

variations a récemment été identifié dans la protéine CHK1 et semble aussi promouvoir son interaction avec les PAR (Min et al., 2013). La structure en doigt de zinc a été confirmée deux ans plus tard et a permis de démontrer que ce motif permettait la reconnaissance de deux molécules d'ADP-ribose reliées entre elles par une liaison glycosidique, soit la jonction entre deux ADP-ribose (Eustermann et al., 2010; Isogai et al., 2010; Oberoi et al., 2010; Figure 4). Ce motif possède une forte affinité pour les PAR : de l'ordre du sub-nanomolaire pour la protéine APLF qui contient deux domaines PBZ en tandem (Li et al., 2010).

4.3 Le macrodomaine

A l'inverse des motifs PBM et PBZ, le macrodomaine est composé d'un motif structuré d'environ 130 à 190 acides aminés. Ce domaine interagit avec l'ADP-ribose terminal du PAR et peut donc à ce titre permettre une interaction avec une protéine porteuse d'un mono ADP-ribose (Ahel et al., 2009 et Figure 4). Jusqu'à maintenant, ce domaine a été identifié dans 11 protéines, incluant les trois macroPARPs présentées précédemment (PARP9, PARP14 et PARP15). On retrouve aussi ce domaine dans le remodeleur de la chromatine ALC1 (Amplified in Liver Cancer 1), dans le variant d'histone macroH2A ou encore dans les monoADP-ribose hydrolases macroD1/2 dont le rôle sera mentionné par la suite (Ahel et al., 2009; Jankevicius et al., 2013; Timinszky et al., 2009a).

4.4 Le motif WWE

Ce motif contenant des résidus tryptophanes (W) et glutamates (E) conservés a été identifié dans 12 protéines jusqu'à maintenant. Le motif WWE n'est retrouvé qu'au sein des protéines de la famille des PARPs et deubiquitine ligases. De façon intéressante, il a été montré que l'activité de certaines E3 ubiquitine ligases requière une liaison avec les PAR via leur motif WWE (DaRosa et al., 2015; Kang et al., 2011). Ceci pourrait indiquer que la PARylation de certaines protéines puisse agir comme un signal pour son ubiquitinylation successive (Wang et al., 2012b). Le motif WWE reconnaît les iso-ADP-riboses avec une forte affinité, soit une unité ADP-ribose au sein de la chaîne de PAR (voir Figure 4) (Wang et al., 2012b). Il est aussi intéressant de noter que ce motif qui

permet la reconnaissance des PAR, n'est pas présent chez les PARPs capables de synthétiser des PAR. Il semble donc exister une distinction entre la capacité de synthèse et la capacité de reconnaissance des PAR.

4.5 Les domaines de reconnaissance de phophorylations (BRCT/FHA)

Les domaines BRCT (BRCA1 C-terminal) et FHA (Forkhead associated) sont bien connus pour avoir une affinité avec protéines phosphorylées (Durocher et al., 2000; Yu et al., 2003). Il a été récemment identifié que ces deux domaines pouvaient aussi avoir une affinité pour les PAR (Li et al., 2013). On retrouve ainsi une interaction entre les domaines FHA de la protéine APTX (Aprataxin) et de la protéine PNKP (Polynucleotide kinase-3-phosphatase) avec les iso-ADP-riboses. Il est aussi probable que le domaine BRCT1 de XRCC1 ou les deux domaines BRCT de la protéine BARD1 (pour BRCA1 associated RING domain 1) soient des domaines d'interaction avec les PAR, permettant par la même occasion leur recrutement et fonction aux sites de dommages de l'ADN (Breslin et al., 2015; Li and Yu, 2013). Néanmoins, le domaine BRCT1 de XRCC1 contient également le domaine PBM précédemment décrit pour interagir avec les PAR (Pleschke et al., 2000b). Il n'est donc pas clairement établi si l'intégralité de la structure du domaine BRCT1 de XRCC1 est requise pour permettre l'interaction de XRCC1 avec les PAR.

Sachant que ces domaines BRCT et FHA permettent une interaction avec les PAR ainsi qu'avec des phospho-protéines, il est possible que les protéines PARylées suite l'induction de l'activité des PARPs entre en compétition avec les protéines phosphorylées par des kinases, modifiant ainsi les réseaux d'interactions protéines-protéines.

4.6 Les domaines d'interaction avec l'ADN ou l'ARN

Plusieurs découvertes récentes ont permis d'identifier que des motifs de liaison à l'ADN ou à l'ARN pouvaient se lier aux PAR. Cette observation renforce d'autant plus l'idée que les PAR possèdent des propriétés proches de celles des acides nucléiques. En effet, comme pour l'ARN, l'ADN ou même les protéines porteuses de phosphorylations, les PAR représentent une structure largement chargée négativement. A ce titre, le terme de troisième acide nucléique a même été

utilisé. Ainsi lorsque la synthèse des PAR est fortement stimulée, l'interaction de certaines protéines avec l'ARN et l'ADN pourrait être réduite.

- Le domaine OB fold (pour oligonucleotide/oligosaccharide-binding) est un domaine protéique bien conservé qui a été identifié chez un groupe de bactéries et chez la levure (Murzin, 1993). Ce domaine permet la reconnaissance de l'ADN simple-brin ou de l'ARN et se retrouve au sein de protéines comme RPA, hSSB1/2, BRCA2 (Pour revue : Flynn and Zou, 2010). Récemment, il a été identifié que ce domaine autorisait la reconnaissance des iso-ADP-riboses et qu'il permettait le recrutement de nombreuses protéines de la réparation aux sites de dommages de l'ADN (Zhang et al., 2014). En particulier, la phase rapide du recrutement de la protéine BRCA2 au site de dommage de l'ADN est dépendante de la reconnaissance des PAR via son domaine OB fold (Zhang et al., 2015a).

- Le motif RRM (pour RNA recognition motif) est l'un des domaines de liaison à l'ARN les plus répandus parmi les protéines qui interagissent avec l'ARN (Pour revue : Maris et al., 2005). Ces dernières années, il est apparu évident que de nombreuses protéines contenant des motifs RRM pouvaient être recrutées aux sites de synthèse des PAR (Adamson et al., 2012; Gagne et al., 2003; Izhar et al., 2015; Krietsch et al., 2012). Ainsi, avec sa structure proche de celle de l'ARN, les PAR induisent une réelle compétition pour l'interaction avec de nombreuses protéines avec l'ARN.

- Le domaine PIN (PilT N terminus) est un domaine bien conservé au cours de l'évolution, permettant une liaison avec l'ADN simple brin ou avec l'ARN. Ce domaine porte aussi une activité nucléase (Arcus et al., 2011). Par exemple, il porte l'activité exo-nucléase de la protéine EXO1 (Exonuclease 1) et l'activité endo-nucléase de la protéine GEN1 (Flap endonuclease GEN homolog 1). Il y a deux ans, il a été identifié que le domaine PIN reconnaissait les PAR *in vitro* et *in vivo* avec une forte affinité de l'ordre du nanomolaire. Cette interaction permet le recrutement rapide de la protéine EXO1 aux sites de dommages de l'ADN. Le domaine PIN de l'endonucléase GEN1 interagit aussi avec les PAR (Zhang et al., 2015b). Il serait ainsi intéressant de déterminer si certaines protéines PARP peuvent ainsi moduler l'activité de ces deux nucléases qui sont impliquées dans différentes étapes de la recombinaison homologue.

- Les domaines riches en sérines et en arginines (domaine SR) ou en glycines et arginines (domaine GAR) se retrouvent dans de nombreuses protéines de liaison à l'ARN. On retrouve ces domaines essentiellement au sein des régulateurs de l'épissage des ARN et au sein des composants des granules de stress (Pour revue : Shepard and Hertel, 2009). Il a été montré récemment que de nombreuses protéines porteuses de ce domaine pouvaient interagir avec les PAR (Isabelle et al., 2012; Malanga et al., 2008). Le mécanisme de reconnaissance des PAR n'est pas caractérisé mais il est probable que les charges positives portées par ce domaine permettent une interaction électrostatique avec les charges négatives des PAR. Ainsi, ces interactions pourraient jouer un rôle clé dans l'épissage des ARN et dans l'assemblage des granules de stress (Leung et al., 2011).

  Finalement, le recrutement et l'agrégation des certaines protéines porteuses de domaines GAR pourrait induire un phénomène complexe et très intriguant de séparation de phase. Ce phénomène physique pourrait se comparer à ce qui se produit lorsqu'une goutte d'huile est déposée dans l'eau. En effet, la synthèse locale des PAR va induire le recrutement de protéines porteuses de domaine GAR comme la protéine oncogène Fus **(**RNA-binding protein FUS). Cette protéine, naturellement désordonnée, est capable de s'agréger dans un mécanisme semblable aux protéines de type prion (Patel et al., 2015). Ce phénomène va induire une réorganisation et une compartimentation de l'environnement autour du lieu de synthèse des PAR. Ceci aurait pour conséquence de favoriser la diffusion locale des protéines et de favoriser certaines interactions protéine-protéine en particulier aux sites de dommages de l'ADN (Altmeyer et al., 2015; Patel et al., 2015). Ce même phénomène pourrait aussi être à l'origine de nombreuses pathologies neurodégénératives associées au vieillissement.

Les découvertes récentes de ces nouveaux domaines d'interaction avec les PAR, ouvrent la voie à une meilleure compréhension dans la biologie des PAR mais posent aussi des interrogations. Par exemple, la synthèse massive de PAR en réponse aux dommages de l'ADN pourrait-elle impacter indirectement d'autres fonctions cellulaires en détournant des protéines de leurs fonctions initiales ?

5. Les gommeurs

Comme pour toutes modifications post-traductionnelles, les chaînes de PAR mais aussi les MAR peuvent être supprimés. Il est en effet essentiel que cette modification soit contrôlée dans le temps.

Premièrement, l'hydrolyse des PAR permet le recyclage des sous-unités d'ADP-ribose et ainsi de maintenir le pool cellulaire de NAD+. Une activation persistante des PARPs a des effets dévastateurs dans la cellule et conduit à une crise énergétique qui inhibe la glycolyse et aboutira à la mort cellulaire par apoptose, aussi appelé Parthanatos (Andrabi et al., 2014; Fouquerel et al., 2014).

Deuxièmement, comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs centaines de protéines qui possèdent des domaines d'interaction avec les PAR s'accumulent rapidement au niveau des polymères. Il est donc essentiel que les PAR soient dégradés par la suite pour ne pas séquestrer ces protéines et ainsi qu'elles puissent assurer leurs fonctions.

Finalement, en entrant en compétition pour la liaison avec l'ARN et l'ADN, les PAR peuvent détourner de leurs fonctions des protéines impliquées dans la maintenance physiologique de l'ADN et de l'ARN. Aussi les PAR conduisent à la formation d'agrégats protéiques favorisant la diffusion locale des protéines. L'absence de recyclage des PAR conduirait à l'accumulation d'agrégats protéiques dans le noyau et dans le cytoplasme et aurait des conséquences dramatiques comme celles observées dans certaines pathologies neurodégénératives.

Plusieurs enzymes sont ainsi importantes dans le turnover de l'ADP-ribose. Jusqu'à maintenant, seules 5 protéines ont été caractérisées comme capables d'hydrolyser les MAR ou les PAR.

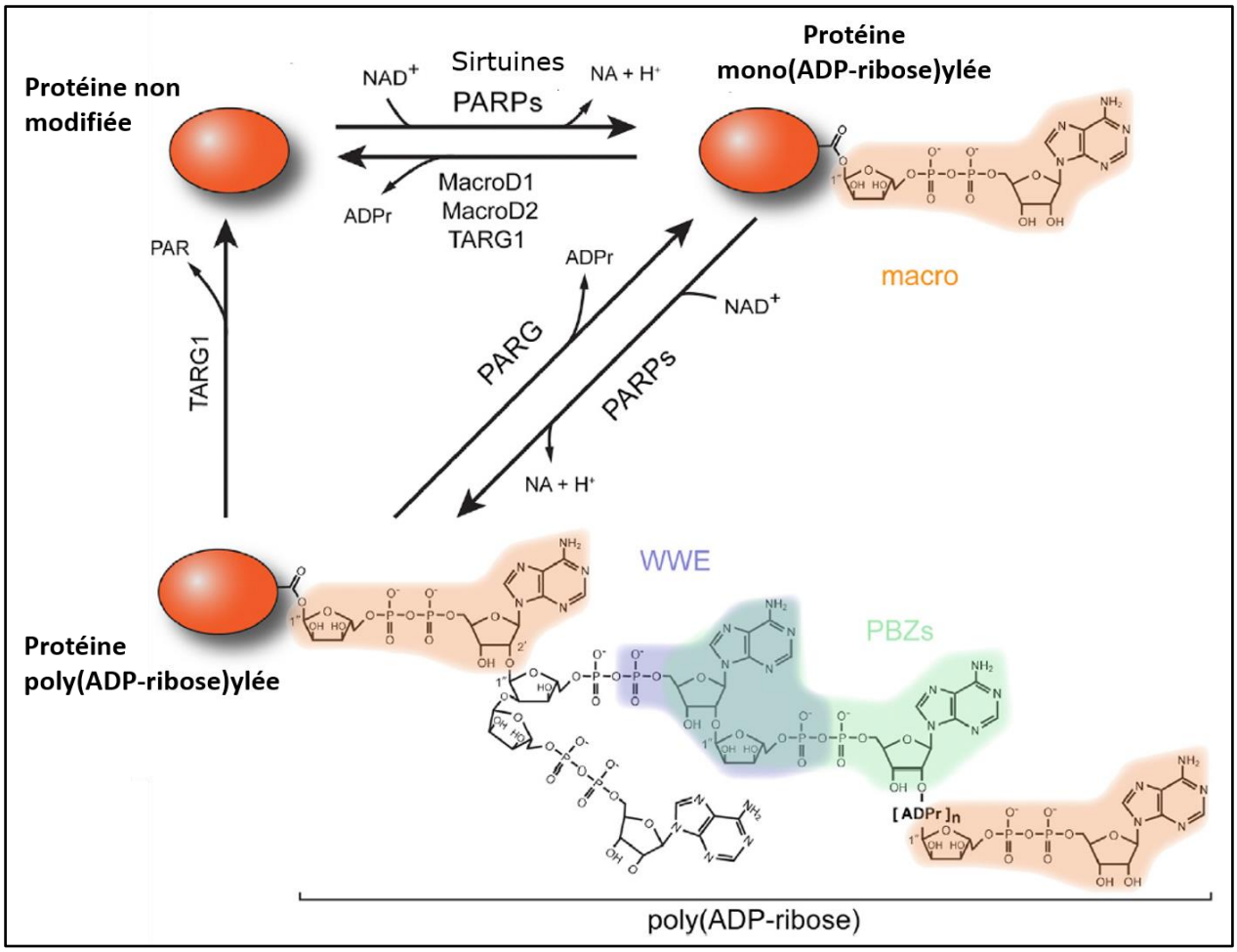


Figure 6 : Le cycle de l'ADP-ribosylation. Les monoPARPs et les sirtuines peuvent catalyser la synthèse d'un MAR et les polyPARPs peuvent synthétiser l'ajout d'un PAR sur une protéine cible. La protéine TARG1 peut hydrolyser l'ensemble d'un PAR ou un MAR. La protéine PARG clive les liaisons ribose-ribose laissant ainsi un MAR sur la protéine cible. Les protéines MacroD1 et MacroD2 hydrolysent les MAR uniquement laissant une protéine non modifiée. NA : Nicotinamide, ADPr : ADP-ribose (Figure adaptée de Barkauskaite et al., 2015)

5.1 La protéine PARG

La protéine PARG (Poly(ADP-ribose) glycohydrolase), a été purifiée en 1972, cinq ans avant la purification de la protéine PARP1 (Ueda et al., 1972). Cette protéine est responsable de la grande majorité de l'hydrolyse des PAR. Pourtant le cDNA de PARG n'a été cloné que 25 ans plus tard rendant difficile l'étude de cette protéine (Lin et al., 1997). Il existe trois isoformes de PARG, différent dans le domaine N-terminal et par leur taille, codant tous pour une protéine fonctionnelle. En effet, les trois isoformes de PARG sont recrutés rapidement aux sites de dommages de l'ADN

via une interaction du domaine catalytique, qui est un macrodomaine (Slade et al., 2011), avec les PAR, et aussi via l'interaction de son domaine PIP en C-terminal avec la protéine PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) (Mortusewicz et al., 2011b). Il existe aussi deux isoformes de PARG qui sont présent au sein de la mitochondrie, mais qui semblent inactif de par l'absence de tout ou partir de l'exon 5 (Niere et al., 2012). PARG va ainsi débuter l'hydrolyse des PAR presque immédiatement après l'activation des PARP et la synthèse des PAR. Au niveau temporel, ce mécanisme est extrêmement bien contrôlé et rend la durée de vie des PAR très courte. L'importance cruciale de PARG a été démontrée *in vivo*, car les souris knock-out pour PARG meurent tôt au cours du développement embryonnaire (Koh et al., 2004). De plus, les cellules embryonnaires issues de ces souris survivent en présence d'un inhibiteur de PARP, ce qui indique que la mortalité de ces souris est bien causée par l'accumulation de PAR.

La structure de la protéine PARG a permis de déterminer que le site catalytique de PARG est en fait dérivé du domaine de reconnaissance des PAR, le macrodomaine (Slade et al., 2011). La spécificité du macrodomaine de PARG est la présence d'une boucle catalytique (GGG-X6-8-QEE) qui lui confère son activité (voir figure 7). PARG possède à la fois une activité exo-glycohydrolase et une activité endo-glycohydrolase. Ainsi PARG peut tout aussi bien dégrader les ADP-ribose successivement à partir de l'extrémité des PAR ou cliver au sein du PAR générant des chaînes libres de PAR dans la cellule (Slade et al., 2011). Ces derniers peuvent d'ailleurs jouer des rôles physiologiques dans la cellule (Andrabi et al., 2006; Brochu et al., 1994). Néanmoins, il semble que l'activité exo-glycohydrolase soit largement majoritaire dans la cellule (Barkauskaite et al., 2013). Ainsi, l'activité PARG hydrolyse les PAR, mais n'est pas capable d'hydrolyser la liaison reliant le premier ADP-ribose à la protéine laissant donc une protéine porteuse d'un MAR (voir figure 6). De même, PARG n'est pas capable d'hydrolyser le produit de la réaction des monoPARPs, ni des sirtuines (Dunstan et al., 2012). Sachant que ces dernières réactions ne sont pas irréversibles, il existe donc des mono-hydrolases impliquées dans l'élimination de ces modifications.

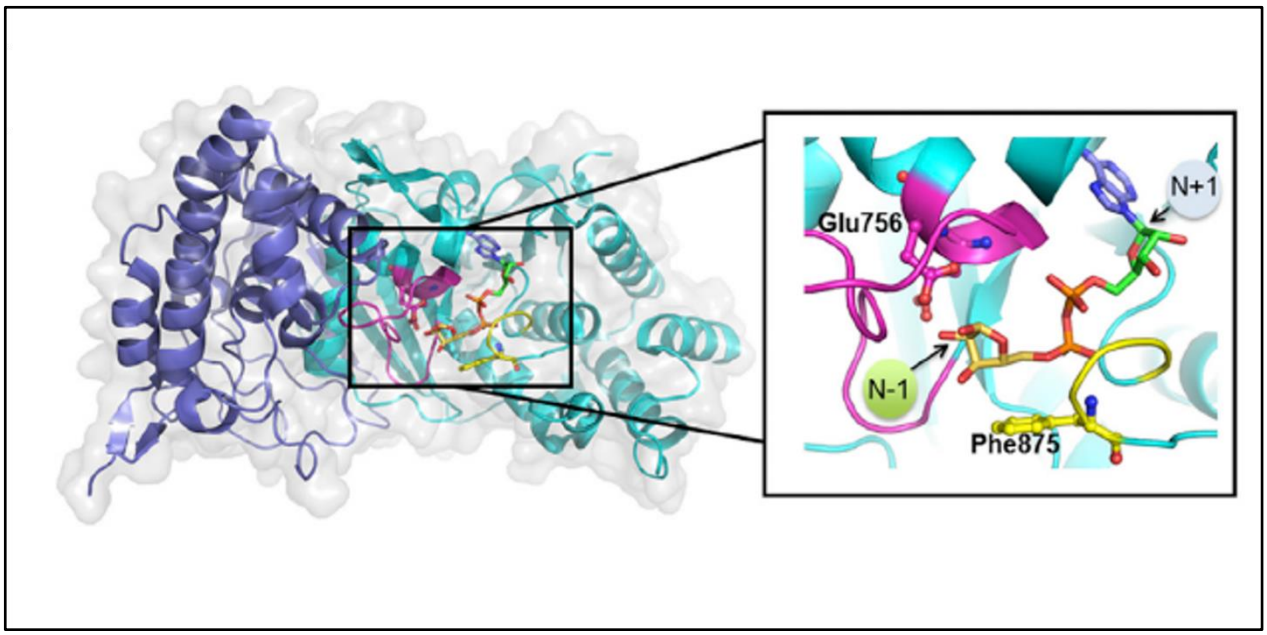


Figure 7 : Structure du site catalytique de la protéine PARG. Au sein de la protéine PARG, le site catalytique est représenté en couleur (gauche). A droite, le site catalytique dans lequel la boucle catalytique est colorée en magenta contient un ADP-ribose. Les deux résidus Glu 756 et Phe875 porteurs de l'activité catalytique sont représentés. L'activité PARG va conduire à l'hydrolyse de la liaison α(1-2) O-glycosidique qui relie les deux unités d'ADP-ribose successives (Figure adaptée de Barkauskaite et al., 2015).

5.2 La protéine ARH3

La protéine ARH3 (pour ADP-ribosyl hydrolase 3) est la seconde enzyme connue capable de dégrader les PAR (Mueller-Dieckmann et al., 2006; Oka et al., 2006). A la différence de PARG, ARH3 ne contient pas de macrodomaine. Cette protéine, comme PARG, hydrolyse la liaison glycosidique présente entre les sous-unités ADP-ribose, laissant ainsi une protéine MARylée. Il semblerait que ARH3 soit responsable de la dégradation des PAR dans la mitochondrie car aucun des deux isoformes de la protéine PARG présents n'y est actif (Niere et al., 2012). ARH3 semble aussi impliquée dans la dégradation des PAR libres dans le noyau et dans le cytosol qui sont produits par l'activité PARG. L'absence d'ARH3 conduit à une accumulation de PAR libres qui vont transloquer dans la mitochondrie et causer la mort cellulaire en réponse à un stress génotoxique (Mashimo et al., 2013). Finalement, il a été identifié que seul ARH3 est capable d'hydrolyser les PAR qui sont ajoutés sur les sérines par les complexes PARP1/HPF1 et PARP2/HPF1 (Ahel et al., 2017).

5.3 La protéine TARG1

Le rôle de la protéine TARG1 (Terminal ADP-ribose protein glycohydrolase) dans l'hydrolyse des PAR et des MAR a été identifié en 2013 (Sharifi et al., 2013). Une mutation de cette protéine a été identifiée chez un patient souffrant d'un syndrome neurodégénératif sévère, ce qui montre l'importance de cette protéine dans la régulation du métabolisme de l'ADP-ribose. De plus, la déplétion de cette protéine induit un fort défaut de prolifération cellulaire ainsi que l'accumulation de dommages de l'ADN. A l'instar de la protéine PARG, le domaine catalytique de TARG1 est fortement semblable à un macrodomaine. Néanmoins, le mécanisme catalytique est lui très différent de celui de PARG. La lysine 84 de TARG1 réalise une attaque nucléophile sur le carbone 1 du ribose proximal, générant ainsi une base de Schiff temporaire. L'aspartate 125 qui est positionné à proximité permet finalement la libération de l'ADP-ribose. Ce mécanisme catalytique peut donc éliminer aussi bien les PAR que les MAR puisqu'il cible la liaison entre la protéine et l'ADP-ribose proximal (voir Figure 6). De façon intéressante, TARG1 semble avoir une spécificité pour cibler l'ADP-ribose présent sur le glutamate (Rosenthal et al., 2013; Sharifi et al., 2013). Bien que l'activité de TARG1 soit beaucoup plus faible que celle de PARG, son activité catalytique relargue obligatoirement un PAR complet, ce qui pourrait avoir des conséquences importantes. En effet, les PAR libres jouent un rôle de signalisation dans un processus de mort cellulaire appelé Parthanatos (Andrabi et al., 2006; Yu et al., 2006).

5.4 Les protéines MacroD1 et MacroD2

Les deux protéines MacroD1 et MacroD2 (O-acetyl-ADP-ribose deacetylase) sont deux enzymes capables d'éliminer un MAR (voir Figure 6). Les deux protéines sont bien conservées et contiennent un macrodomaine très similaire et porteur de leur activité. Mais leurs autres domaines ne sont pas bien caractérisés (Jankevicius et al., 2013). L'activité de MacroD1 et de MacroD2 conduit uniquement à l'élimination des MAR car ces protéines ne sont pas actives sur les PAR. De façon intéressante, comme pour la protéine TARG1, l'activité de leurs macrodomaines semble spécifique aux modifications du glutamate (Rosenthal et al., 2013). Néanmoins, il semble que le mécanisme catalytique soit différent. Cette observation ouvre donc la voie à la recherche de

nouvelles enzymes capable d'hydrolyser les MAR qui ont été ajoutés sur d'autres résidus que les glutamates.

L'ensemble de ces observations met donc en évidence l'existence probable d'un code permettant une régulation fine du métabolisme de l'ADP-ribose. On peut supposer que les PARP existent sous la forme de multiples sous-complexes permettant le ciblage de certains résidus cibles ou encore de certaines protéines. A l'inverse, l'hydrolyse des MAR ou des PAR dépend de plusieurs protéines « gommeuses » qui possèdent des localisations cellulaires et des activités finement régulées. Ce modèle permet d'expliquer comment les PARPs peuvent jouer un rôle distinct dans de multiples processus cellulaires. A l'avenir, il sera essentiel de déterminer comment l'activité des PARP est régulée, aussi bien au niveau basal, qu'en réponse aux dommages de l'ADN.

CHAPITRE 2 :
Les fonctions des protéines PARP1, PARP2 et PARP3 au cours de la réparation de l'ADN

Dans de la partie précédente, j'ai détaillé le métabolisme de l'ADP-ribosylation en décrivant les différentes enzymes impliquées dans la régulation de cette modification post-traductionnelle des protéines. Nous avons vu que la très grande majorité des PAR sont synthétisés par les protéines PARP1 et PARP2 et que les activités enzymatiques des protéines PARP1, PARP2 et PARP3 sont fortement stimulées en réponse aux cassures de l'ADN. Dans cette partie, j'évoquerais ainsi les rôles multiples de ces trois protéines en réponse à l'induction de cassures simple ou double-brins de l'ADN.

Dans la première partie de ce chapitre, je détaillerais les fonctions multiples des protéines PARP1 et PARP2 et du rôle de leur synthèse d'ADP-ribose lors de la réparation des dommages de bases et des cassures simple-brin de l'ADN. De plus, les PAR favorisent la mise en place de nombreuses interactions protéiques durables. XRCC1 est l'une des premières protéines à avoir été identifiée comme étant recrutée aux sites de dommages de l'ADN via son interaction avec PARP1 auto-PARylé (Masson et al., 1998b). Le rôle de XRCC1 dans la réparation de l'ADN sera également détaillé dans cette section.

Dans la seconde partie de ce chapitre, j'introduirais les différentes voies de la réparation des cassures double-brins de l'ADN, et les rôles de PARP1, PARP2 et PARP3 dans ces mécanismes seront exposés.

Dans la troisième partie de ce chapitre, j'aborderais comment le choix des voies de la réparation des cassures double-brins de l'ADN est fait et permet d'assurer le maintien de la stabilité du génome. Les fonctions multiples des protéines BRCA1 et 53BP1, deux acteurs majeurs dans ce choix, seront définies.

Finalement, j'expliquerais pourquoi l'inhibition des fonctions des PARPs peut offrir un intérêt thérapeutique chez certains patient(e)s atteints de cancers.

L'ADN est le support de l'information génétique et il est maintenant bien établi que comme toute molécule chimique, l'ADN peut être soumis à une décomposition spontanée impliquant hydrolyse, oxydation et méthylation (Pour revue : Lindahl, 1993). De plus, de nombreux agents exogènes (radiation ionisante, rayonnement UV, agents chimiques) ou endogènes (métabolites, radicaux libres) peuvent être responsable de multiples lésions de l'ADN (Pour revue : Cheung-Ong et al., 2013; De Bont and Van Larebeke, 2004). Finalement, des processus cellulaires comme la réplication et la transcription peuvent aussi conduire à la formation structures de l'ADN nécessitant des enzymes spécifiques pour leur résolution. La persistance de ces lésions va conduire à l'arrêt du cycle cellulaire, à la mort cellulaire ou à la sénescence mais peut aussi être à l'origine de mutations et d'instabilité génétique qui peuvent être responsables de la transformation tumorale.

Il existe de multiples types de lésions de l'ADN (voir figure 8). En effet, virtuellement chaque composante de la structure de l'ADN (bases azotées, désoxyribose, phosphates) peut être altérée. Ainsi, les bases peuvent être oxydées, alkylées, déaminées ou même éliminées. Des interruptions dans le squelette ribose-phosphate de l'ADN peuvent aussi avoir lieu générant ainsi des cassures simple-brin (CSBs) ou des cassures double-brins (CDBs) de l'ADN. Des pontages covalents entre pyrimidines (dimères de pyrimidines) ou entre brins (pontages inter-brins) peuvent se former après une exposition aux UV ou encore des pontages entre l'ADN et des protéines induits par certains agents chimiques. Finalement, des erreurs de réplication de l'ADN peuvent causer des mésappariements de bases.

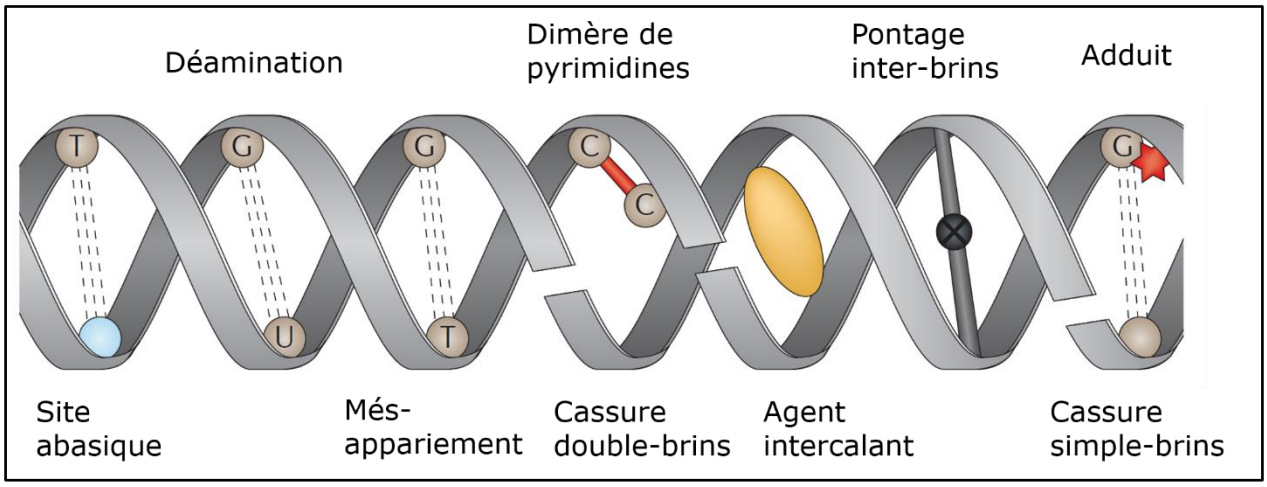


Figure 8 : Les différents types de dommages de l'ADN (Figure adaptée de Helleday et al., 2014)

Un ensemble de systèmes pour coordonner la prise en charge des lésions de l'ADN et assurer la stabilité du génome a été développé dans le monde du vivant. Il existe chez les organismes eucaryotes plusieurs voies permettant la détection et la réparation des lésions de l'ADN. On peut citer la voie de réparation par excision de base (BER), la voie de réparation des cassures simple (SSBR) ou double-brins de l'ADN (DSBR), la voie de réparation par excision de nucléotides (NER) ou encore la voie de réparation des mésappariements (MMR) (Pour revue : Sancar et al., 2004). Ces voies de la réparation ont chacune leurs spécificités concernant le type de lésions qu'elles sont capables de détecter et de réparer.

De nombreuses redondances existent entre ces différentes voies de la réparation alors que certaines connexions peuvent quelquefois conduire à une compétition entre différentes voies pour la réparation de certaines lésions de l'ADN. Par exemple, la réparation des CDBs de l'ADN peut s'effectuer par au moins quatre voies de la réparation, dont la fidélité n'est pas homogène. De plus, certaines protéines peuvent être impliquées dans plusieurs voies de la réparation.

Mais au final, les multiples acteurs de la réparation sont essentiels au maintien de la stabilité du génome et pour contribuer au maintien de l'intégrité des fonctions cellulaires à l'échelle de l'individu. Néanmoins, une diversité génétique programmée est nécessaire au cours du développement du répertoire antigénique ou encore lors de l'échange des allèles parentaux au cours de la méiose pour assurer la reproduction. De plus, l'introduction d'une diversité génétique est le moteur de l'évolution. La fidélité des mécanismes de la réparation de l'ADN doit donc être régulée de façon optimale pour que la balance fragile entre maintien de l'intégrité du génome et instabilité génétique ne penche pas exagérément dans un sens ou dans l'autre.

Au cours de cette partie, je m'attarderai uniquement à la description de la prise en charge des dommages de bases et des cassures simple- et double-brins de l'ADN. En effet, nous avons vu précédemment que l'activité de PARP1 et de PARP2 est très fortement stimulée lors de la reconnaissance des cassures de l'ADN. Les cassures simple-brin de l'ADN sont l'un des intermédiaires de la réparation de dommages de bases, une voie de réparation dont XRCC1 est une protéine centrale. Ainsi, PARP1, PARP2 et XRCC1 jouent un rôle primordial dans la coordination des étapes de la réparation du BER et des cassures de l'ADN.

1. PARP et BER

La réparation des dommages de bases par la voie du BER est un processus hautement conservé au cours de l'évolution. Cette voie de la réparation est en charge de la réparation des dommages de bases. Ces lésions, qui ne conduisent pas à une distorsion majeure de la double hélice d'ADN, proviennent essentiellement de la décomposition spontanée de l'ADN qui représente des réactions de déaminations, d'alkylation ou encore d'oxydation (Pour revue : Lindahl, 1993). Les radiations ionisantes ou certains agents oxydants et alkylants conduisent aussi à la formation de nombreux dommages de bases.

L'initiation du BER dépend de la reconnaissance des lésions de bases par une famille de protéines spécialisées appelées glycosylases. Brièvement, les glycosylases éliminent la base endommagée, puis l'action des glycosylases bifonctionnelles ou de l'endonucléase APE1 (Apurinic-apyrimidinic endonuclease 1) clive le site abasique générant ainsi une cassure simple-brin de l'ADN. Après que les extrémités d'ADN aient été nettoyées, une nouvelle base est ensuite synthétisée et la jonction est scellée par une ADN ligase. La réparation par la voie du BER peut donc se résumer en quatre étapes principales : élimination de la base endommagée, nettoyage des extrémités d'ADN, resynthèse de l'information génétique par une ADN polymérase et ligation des deux extrémités (Pour revue : Krokan and Bjoras, 2013; Parsons and Dianov, 2013) (voir figure 9).

Il est important de noter que la réparation des dommages de bases est intrinsèquement liée à celle des CSBs de l'ADN et cela pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la réparation par le BER est une source majeure de CSBs dans nos cellules. En effet, les étapes finales de ces voies de la réparation sont donc communes et certaines enzymes comme les protéines PARP1 et surtout XRCC1 sont importantes pour les fonctions du BER et du SSBR. Ainsi, dans cette partie je définirai donc la voie du SSBR comme une sous-voie du BER (voir figure 9).

1.1 La reconnaissance des dommages de base : les glycosylases

Les multiples structures des différents dommages de bases ne seront pas tous détaillées dans cette introduction (Jacobs and Schär, 2012). On estime à au moins 10 000 le nombre de dommages

de bases produits naturellement par jour dans chacune de nos cellules (Tableau 2 et pour revue : Barnes and Lindahl, 2004). Pourtant, la fréquence des mutations de bases est de l'ordre de 10^{-10} par base, par génome et par réplication, suggérant l'existence de mécanismes de réparation très performants (Drake et al., 1998). On peut néanmoins citer la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG), qui est un des produits d'oxydation les plus fréquents induits par les ROS ou encore des formes telles que la O6-methylguanine (6-meG) ou la N7-methylguanine (7-meG) produites par alkylation. Il est essentiel de prendre en charge ces lésions car beaucoup d'entre elles sont mutagènes.

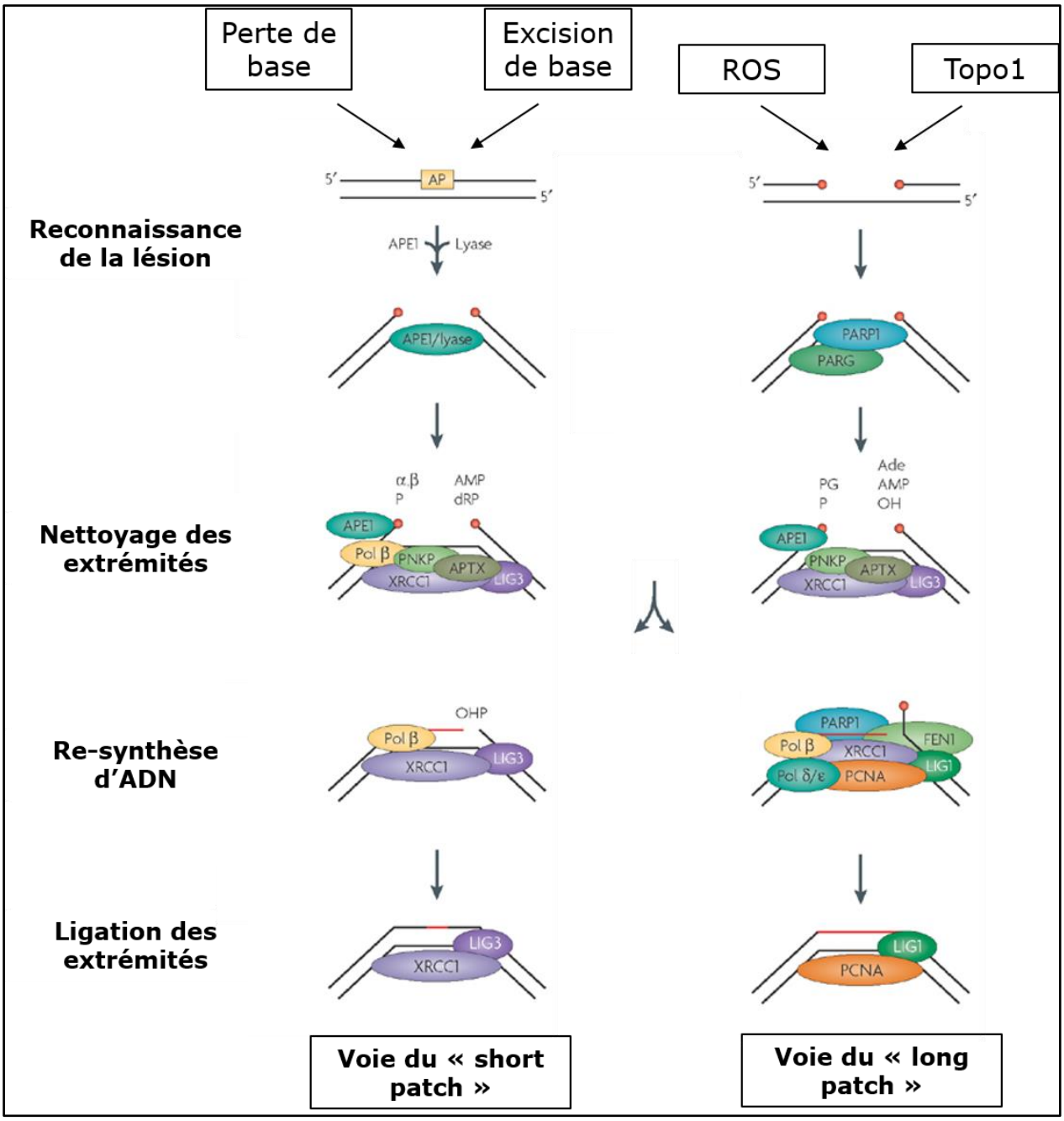


Figure 9 : Résumé de la voie du BER-SSBR. Les dommages de bases sont pris en charges par la famille des glycosylases générant un site abasique substrat de l'endonucléase APE1 générant une CSB. Les ROS et l'activité de TOP1 peuvent aussi produire directement des CSBs permettant le recrutement et l'activation de PARP1 (et de PARP2). Les extrémités sont ensuite nettoyées par différentes enzymes dont APE1, PNKP (Polynucleotide kinase-3'-phosphatase), APTX (Aprataxin) et la polymérase β générant un substrat pour la synthèse d'un nucléotide par la polymérase β. La ligation dépendant de l'ADN ligase 3 en complexe avec XRCC1, c'est la voie du « short patch ». Alternativement, la machinerie de la réplication peut synthétiser jusqu'à 12 nucléotides et la ligation dépendra de l'ADN ligase 1, c'est la voie du « long patch » (Figure adaptée de Caldecott, 2008).

Par exemple, la 8-oxoG s'apparie naturellement avec l'adénine produisant ainsi des transversions G-C vers T-A. De même, la 6-meG est mutagène car elle peut s'apparier avec une thymine alors que la 7-meG est cytotoxique car elle bloque la progression de la réplication de l'ADN (Pour revue : Lindahl and Wood, 1999).

La détection de ces lésions de base repose sur une famille d'enzymes appelée glycosylase. Les glycosylases sont des d'enzymes très bien conservées au cours de l'évolution. L'Ung (Uracil-DNA glycosylase) est la première d'entre-elles à avoir été purifiée en 1974 chez *Escherichia coli* par Tomas Lindahl, ce qui a permis de proposer les étapes fondamentales du BER dès cette année (Lindahl, 1974; Miller and Goodman, 2016). Chez les mammifères, 11 glycosylases ont été identifiées à ce jour (Dizdaroglu et al., 2017). Il est proposé que chaque glycosylase scanne continuellement la double-hélice à la recherche de lésions de bases (Hegde et al., 2008a). Le site actif de chaque glycosylase possède une affinité pour différents types de dommages à l'ADN (voir tableau 2). Une fois qu'une glycosylase interagit avec une base endommagée, la base est retournée hors de l'ADN et placée au sein du site actif de la glycosylase causant ainsi une courbure de l'ADN (Friedman et al., 2009; Slupphaug et al., 1996). Si la lésion est un substrat de la glycosylase, il y aura alors clivage de la liaison N-glycosidique reliant la base au désoxyribose générant ainsi un site abasique. La liaison phosphodiester est ensuite clivée en 5' du site abasique par APE1 produisant une CSB avec une extrémité 5'désoxyribose phosphate et une extrémité 3'hydroxyl (3'OH).

En plus de l'activité glycosylase, les protéines OGG1, NEIL1 et MPG possèdent une activité AP-lyase qui leur permet en plus, de cliver le site abasique produisant ainsi directement une CSB (Bruner et al., 2000; Nash et al., 1997; Sun et al., 1995). Ces glycosylases sont dites bifonctionnelles par opposition aux glycosylases monofonctionnelles qui ne possèdent cette activité AP-lyase.

La protéine XRCC1 est essentielle pour toutes ces réactions enzymatiques. En effet, XRCC1 interagit avec les glycosylases et stimule l'activité de certaines d'entre elles. En revanche, les protéines PARP1 et PARP2 ne semblent pas essentielles dans la détection des lésions de bases. En effet, il a été montré récemment que la synthèse des PAR n'était pas nécessaire pour le recrutement de la glycosylase OGG1 (Campalans et al., 2013). De plus PARP1 ne semble pas avoir d'affinité pour les bases endommagées (Cistulli et al., 2004; Khodyreva et al., 2010; Lavrik et al., 2001).

Finalement, la synthèse de PAR n'est pas nécessaire pour l'excision de la guanine alkylée, 7-meG (Cleaver et al., 1983).

Tableau 2 : Les différents types de glycosylases et leurs substrats. *U*, uracil; , *A*, adenine; , *T*, thymine; , *C*, cytosine, *G*, guanine; , *5--hm*, 5--hydroxymethyl; , *5-FU*, 5-fluorouracil; , *ε*, etheno; , *5-fC*, 5-formylcytosine; , *5-caC*, 5-carboxylcytosine; , *8--oxoG*, 8--oxo-7,8-dihydroguanine; , *Tg*, thymine glycol; , *FaPy*, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-*N*-methylformamidopyrimidine; , *me*, methyl; , *h*, hydroxyl ; , *Mono*, Monofonctionnelle ; , *Bi*, Bifonctionnelle (Tableau adapté de Jacobs and Schär, 2012).

Type de lésion	Nom		Substrats	
Uracile dans l'ADN	UNG	Uracil-N glycosylase	U, 5-FU,	Mono
	SMUG1	Single-strand-specific monofunctional uracil DNA glycosylase 1	U, 5-hmU, 5-FU	Mono
Mésappariements contenant des dérivés de pyrimidines	MBD4	Methyl-binding domain glycosylase 4	T, U, 5-FU, εC, opposite G, dsDNA	Mono
	TDG	Thymine DNA glycosylase	T, U, 5-FU, εC, 5-hmU, 5-fC, 5-caC; opposite G,	Mono
Dommages de bases oxidatifs	OGG1	8-OxoG DNA glycosylase 1	8--oxoG, FaPy, opposite C,	Bi
	MYH	MutY homolog DNA glycosylase	A opposite 8--oxoG, C or G, 2--hA opposite G,	Mono
Purines Alkylées	MPG	Methylpurine glycosylase	3--meA, 7-meG, 3-meG, hypoxanthine, εA,	Mono
Pyrimidines oxydées	NTHL1	Endonuclease III-like 1	Tg, FaPyG, 5-hC, 5-hU	Bi
	NEIL1	Endonuclease VIII-like glycosylase 1	Tg, FaPyG, FaPyA, 8-oxoG, 5--hU, 5--hC	Bi
	NEIL2	Endonuclease VIII-like glycosylase 2	As NTHL1 and NEIL1	Bi
	NEIL3	Endonuclease VIII-like glycosylase 3	FaPyG, FaPyA, prefers ssDNA	Bi

Le nombre de lésions de bases et les glycosylases génèrent un vaste nombre de combinaisons de réactions enzymatiques possibles. Chacune de ces réactions produit des extrémités d'ADN différentes qui sont prises en charge par de multiples protéines pour permettre la synthèse d'ADN ultérieure (Krokan and Bjoras, 2013) (voir aussi section 1.3 page 62 de ce chapitre).

1.2 Détection des cassures simple-brin

Comme décrit ci-dessus, l'action des glycosylases ou l'action de l'AP endonucléase APE1 au niveau d'un site abasique lors la voie de réparation du BER génère une CSB qui est une interruption du squelette ribose-phosphate de l'ADN (Strom et al., 2011). L'une des autres sources de CSB résulte de l'activité abortive de l'ADN topoisomérase 1 (TOP1). En effet, dans un processus physiologique normal pour relaxer l'ADN au cours de la transcription et de la réplication, l'activité enzymatique de TOP1 produit des CSBs transitoires au sein de la double hélice de l'ADN (voir figure 10). En revanche, la collision de cet intermédiaire ADN lié de façon covalente à la TOP1 avec l'ADN ou l'ARN polymérase, peut produire des CDBs (El-Khamisy et al., 2005a). Une autre des causes majeures des CSBs est l'attaque oxydative de l'ADN par des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Par exemple, les radicaux dérivés du peroxyde d'hydrogène ou H_2O_2, ont une propension 2000 fois plus importante à induire des CSBs que des CDBs (Bradley and Kohn, 1979). Les CSB peuvent ainsi être causées directement par l'action des ROS sur l'ADN.

Dans l'ensemble les cassures simple-brin de l'ADN font parties des lésions les plus fréquentes de l'ADN et l'accumulation de CSBs, peut conduire à une hyper-activation des protéines PARP, qui sont les senseurs de ce type de lésions. Cette hyper-activation va induire une inhibition de la glycolyse qui conduira à la mort cellulaire par apoptose (Andrabi et al., 2006; Andrabi et al., 2014; Fouquerel et al., 2014). Une autre conséquence d'une accumulation des CSBs sera la formation d'une CDB à une extrémité, lors de la rencontre d'une fourche de réplication avec une CSB en phase S ou avec la machinerie de la transcription. Bien que les cellules eucaryotes puissent gérer ces scénarios par plusieurs mécanismes (Pour revue : Cortez, 2015), l'accumulation excessive de CSBs peut conduire à de l'instabilité génétique ou à la mort cellulaire.

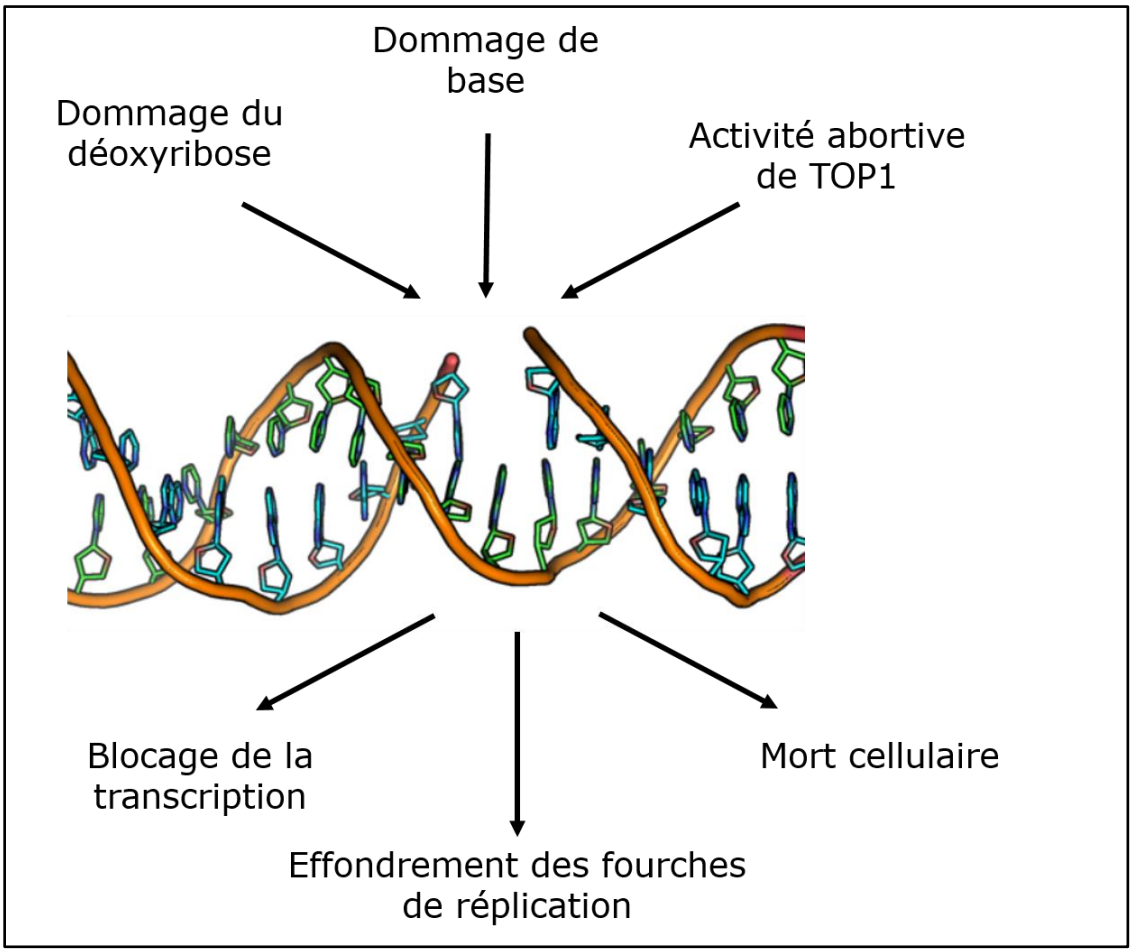


Figure 10 : Les causes physiologiques et conséquences des cassures simple-brin. Les CSB sont majoritaires causées par une désintégration du désoxyribose ou indirectement par la prise en charge d'un dommage de base. L'activité abortive de TOP1 conduit aussi à l'accumulation de CSBs. Si les CSBs ne sont pas prises en charge rapidement ou de façon appropriée, elles peuvent résulter en l'effondrement des fourches de réplication, l'arrêt de la transcription ou encore la mort cellulaire (parfois associée avec une hyperactivation des PARPs).

La détection des CSBs semble essentiellement dépendante de la protéine PARP1 et conduit à son activation et à la synthèse de PAR. Comme nous l'avons vu précédemment (voir page 29), la reconnaissance d'une CSB par les différents domaines à doigt de zinc de PARP1 va transmettre le signal et modifier la conformation du site catalytique de PARP1, permettant ainsi la liaison du NAD+ et l'activation de PARP1 (Eustermann et al., 2011; Langelier et al., 2011; Langelier et al., 2010; Langelier et al., 2012; Tao et al., 2008). L'activation de PARP1 nécessite aussi que la protéine soit sous forme de d'homo-dimère (Altmeyer et al., 2009; Panzeter and Althaus, 1994; Pion et al., 2005). La protéine PARP2 est aussi recrutée rapidement aux sites de dommages de

l'ADN, mais il n'est pas clairement établi si PARP2 participe aux étapes initiales de la détection des CSBs. En effet, PARP2 semble être recruté plus tardivement que PARP1 aux sites de photo-dommages induits par microirradiation laser (Mortusewicz et al., 2007) et PARP2 semble être préférentiellement activé par des lésions de type « gaps » et « flaps », qui sont des intermédiaires plus tardifs de la réparation des CSBs (Kutuzov et al., 2013a; Langelier et al., 2014b; Obaji et al., 2016; Sukhanova et al., 2016). Néanmoins, il est intéressant de noter que PARP2 qui fonctionne aussi sous la forme d'homo-dimère, peut aussi s'hétéro-dimériser avec PARP1. (Schreiber et al., 2002). Par ailleurs, il a été observé que la synthèse des PAR de PARP1 seul était plus élevée que lorsque les protéines PARP1 et PARP2 sont en présence l'une avec l'autre, suggérant que PARP2 réduit l'activité de PARP1 au sein de l'hétéro-dimère PARP1-PARP2 (Kutuzov et al., 2013a).

L'activation de PARP1 et de PARP2 va conduire à leur automodification en trans et aussi à la PARylation des histones adjacentes (Mendoza-Alvarez and Alvarez-Gonzalez, 1993). Cette PARylation des histones, dont l'histone H1 en particulier, permet la relaxation de la structure de la chromatine et facilite probablement ainsi l'accès des enzymes de la réparation à la lésion d'ADN. Il est proposé que l'accumulation de charges négatives sur l'histone H1 diminue fortement son affinité pour l'ADN. (Huletsky et al., 1989). De plus, la synthèse de PAR permet le recrutement de nombreux facteurs de remodelage de la chromatine ou de variants d'histones (Ahel et al., 2009; Chou et al., 2010; Ismail et al., 2012; Pan et al., 2012; Smeenk et al., 2013; Timinszky et al., 2009b). Il est proposé que ces complexes de remodelage de la chromatine vont d'une part faciliter l'accès des protéines de la réparation, et de l'autre inhiber localement la transcription pour éviter une collision de la machinerie de transcription avec la lésion (voir figure 11). Cette modification locale de la chromatine semble être essentielle à la fois pour la réparation des CSBs que de celle des CDBs. Seul le rôle de PARP1 a été étudié dans ce processus, et le rôle éventuel de PARP2 n'est pas connu.

Une seconde conséquence essentielle de la synthèse de PAR est le recrutement rapide de la protéine XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN. Non seulement XRCC1 interagit avec PARP1 et PARP2, mais a également une forte affinité pour les PAR via son domaine PBM situé dans son domaine BRCT1 (voir figure 5, page 38) (Lan et al., 2004; Okano et al., 2003; Schreiber et al., 2002). XRCC1 est aussi PARylé directement par PARP1 mais la fonction de cette modification directe n'est pas connue (Masson et al., 1998a). Il semblerait que le recrutement de XRCC1 soit

essentiellement dépendant de PARP1 (Mortusewicz et al., 2007). Néanmoins une étude récente dans une lignée cellulaire épithéliale issue de la rétine (RPE) implique aussi PARP2 (Hanzlikova et al., 2017). Le recrutement de XRCC1 est essentiel pour assurer la réparation des CSBs de l'ADN. En effet, même si XRCC1 ne possède pas d'activité enzymatique, cette protéine, en plus de coordonner les étapes initiales du BER, va également coordonner des étapes de la voie de réparation des CSBs (Figure 9).

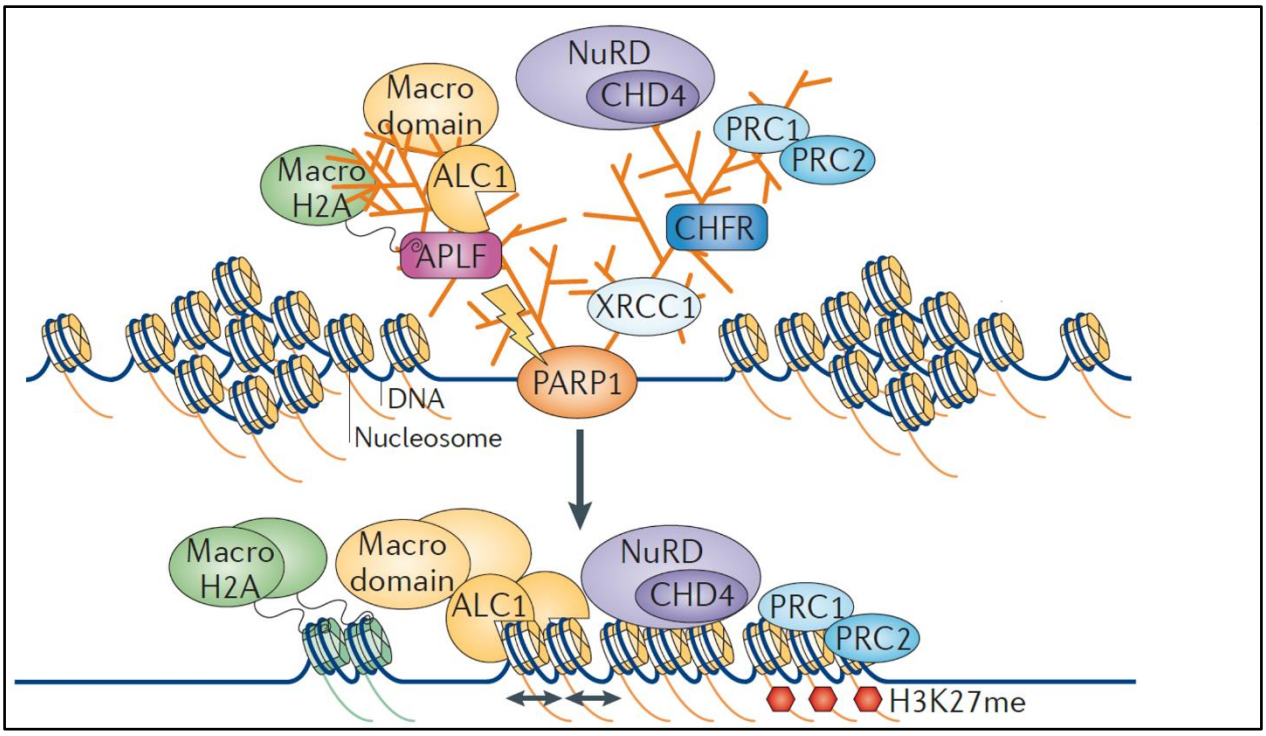


Figure 11 : Mécanismes de modification de la structure de la chromatine par PARP1. En réponse à l'induction de cassures de l'ADN, PARP1 est recruté et activé. L'activation de PARP1 conduit à son automodification et à la PARylation des histones adjacentes. Les protéines XRCC1 et CHD4 sont recrutées aux sites de dommages via leur domaine PBM. CHD4 est un membre du complexe NuRD impliqué dans la répression transcriptionnelle (nucleosome remodelling and histone deacetylase complex). Les protéines APLF et CHFR sont recrutées via leur domaine PBZ. ALC1 et le variant d'histone macroH2A1.1 possèdent un macrodomaine. Les protéines Polycomb PRC1 et PRC2 vont produire un environnement répresseur de la transcription en catalysant la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3. Les protéines ALC1 et APLF vont éjecter, remplacer ou déplacer les nucléosomes qui sont à proximité de la lésion (Figure adaptée de Gibson and Kraus, 2012a).

L'interaction de XRCC1 avec PARP1 et PARP2 diminue aussi drastiquement leur activité (Masson et al., 1998b; Schreiber et al., 2002). De façon contre-intuitive, ceci pourrait permettre de

stabiliser PARP1 et PARP2 au site de dommage de l'ADN, car la dissociation de ces deux protéines est dépendante de leur activité enzymatique. En effet, l'ajout de PAR fortement chargé négativement sur PARP1 et PARP2 va induire leur dissociation par un mécanisme de répulsion électrostatique des charges avec l'ADN chargé lui aussi négativement (Ferro and Olivera, 1982; Zahradka and Ebisuzaki, 1982). Ainsi les protéines PARP1 et PARP2 sont importantes dans les étapes précoces de la réparation des CSBs. La déplétion de PARP1 ou son inhibition retarde la cinétique de réparation des CSBs (Ding et al., 1992; Durkacz et al., 1980; Fisher et al., 2007a; James and Lehmann, 1982; Le Page et al., 2003; Lehmann and Broughton, 1984; Morgan and Cleaver, 1983; Schraufstatter et al., 1986; Trucco et al., 1998). De façon intéressante, la déplétion de PARP2 affecte autant la cinétique de réparation des CSBs que celle de PARP1 après un traitement des cellules avec l'agent alkylant MNU (N-méthyl-N-nitrosourea) (Schreiber et al., 2002). Ceci laisse supposer que les deux protéines sont aussi importantes l'une que l'autre dans la réparation des CSBs. De plus, les souris KO pour PARP2 sont extrêmement sensibles aux radiations ionisantes, et cette radiosensibilité est dépendante du niveau d'expression de PARP2 puisque les souris hétérozygotes sont moins sensible que les souris KO, mais sont plus sensibles que les souris sauvages (Menissier de Murcia et al., 2003). Bien que la capacité de la protéine PARP2 à synthétiser des PAR soit plus faible que celle de PARP1 (15% versus 85%), l'importance de la protéine PARP2 sur la survie chez la souris en réponse aux radiations ionisantes est comparable à celle de PARP1. Il est donc possible que des fonctions non-enzymatiques de PARP2 soient essentielles dans la résistance à des agents génotoxiques.

Un rôle de PARP3 dans la reconnaissance et la réparation des CSBs de l'ADN a aussi été suggéré (Grundy et al., 2016). En effet, la cinétique de résolution des CSBs est ralentie dans une lignée lymphoblastique de poulet KO pour PARP3 (Grundy et al., 2016). Cependant, cette observation n'est pas reproduite dans une lignée murine n'exprimant pas PARP3 (Boehler et al., 2011a). La confirmation d'un rôle de PARP3 lors de la réparation des CSBs de l'ADN nécessitera donc des études futures.

1.3 Nettoyage des extrémités d'ADN

La synthèse d'ADN par une ADN polymérase nécessite une extrémité 5'phosphate et une extrémité 3'hydroxyle (3'OH). Dans la très grande majorité des cas, les extrémités de la cassure sont modifiées et ne sont pas aptes à permettre la synthèse ultérieure d'ADN, nécessaire à la réparation. Ces extrémités doivent donc être nettoyées pour reformer une extrémité 5'phosphate et 3'OH. Cette réaction implique de nombreux enzymes et je ne mentionnerai que certaines d'entre-elles dans cette partie (Abbotts and Wilson, 2016). Au cours de ces étapes de maturation des extrémités, la protéine XRCC1 semble jouer un rôle de coordinateur comme dans les premières étapes de reconnaissance et d'excision des dommages de base lors du BER.

Une des enzymes prédominantes dans l'élimination des modifications bloquantes en 3' est l'endonucléase APE1 (Tableau 3). L'importance de son activité est mise en évidence par la mortalité embryonnaire des souris KO pour APE1 (Xanthoudakis et al., 1996a). De plus, la mutation ou la diminution de l'expression d'APE1 conduit à la mort cellulaire par apoptose, causée par une accumulation de CSB (Izumi et al., 2003; Mitra et al., 2007). APE1 possède une activité AP lyase qui lui permet de cliver la liaison phosphodiester en position 5' des sites abasiques générés par l'action des glycosylases monofonctionnelles, produisant ainsi une CSB avec une extrémité hydroxyle en position 3' et un désoxyribose phosphate (5'-dRP) en position 5' de la CSB (Demple and Harrison, 1994; Parsons et al., 2004a). L'extrémité 5'-dRP est ensuite excisée par l'intermédiaire de l'activité 5'-dRP lyase de la polymérase β (Matsumoto and Kim, 1995). L'activité AP lyase de APE1 est aussi impliquée dans le clivage de l'extrémité 3'désoxyribose phosphate qui provient de l'action des glycosylases bifonctionnelles comme OGG1 ou NTHL1 ou qui est retrouvée au niveau des CSB produites directement par oxydation. Finalement, APE1 est aussi essentielle pour hydrolyser les extrémités 3'-phosphoglycolate qui sont souvent produites par irradiation (Parsons et al., 2004b). L'activité kinase permet de phosphoryler les extrémités 5'OH.

Tableau 3: Substrats des différentes enzymes impliquées dans le nettoyage des extrémités bloquantes en 5' et en 3'. Les enzymes en vert interagissent avec XRCC1, celles en orange interagissent avec PARP1 et XRCC1 et celles en bleues interagissent avec XRCC1 et possèdent un domaine de liaison avec les PAR (Abbotts and Wilson, 2016).

5' lesions	5'-hydroxyl	5'-aldehyde	5'-deoxyribose phosphate	5'-adenylate (AMP)
Repair enzyme:	PNKP	POLβ, FEN1	POLβ	APTX, FEN1
3' lesions	**3'-phosphate**	**3'-phosphoglycolate**	**3'-phospho-α,β-unsaturated aldehyde**	**3'-TOP1 adduct**
Repair enzyme:	PNKP	APE1	APE1	TDP1

La polynucléotide kinase (PNKP) est aussi importante dans le nettoyage des extrémités et possède une double activité 5'-kinase et 3'phosphatase (Jilani et al., 1999). L'activité phosphatase est importante pour générer une extrémité 3'OH à partir de l'extrémité 3'phosphate qui est produite par les glycosylases NEIL1 et NEIL2 (Wiederhold et al., 2004).

La Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) est une protéine impliquée essentiellement dans l'hydrolyse de la liaison covalente entre la topoisomérase 1 et l'extrémité 3' de l'ADN (Pouliot et al., 1999; Yang et al., 1996), produisant ainsi une CSB contenant une extrémité 3'-phosphate qui sera prise en charge par la protéine PNKP (Tableau 3). L'importance de l'activité de cette protéine est démontrée car une mutation ponctuelle homozygote de *Tdp1* est responsable du syndrome

autosomique récessif d'ataxie spinocérébelleuse-neuropathie axonale de type 1 (El-Khamisy et al., 2005b; Interthal et al., 2005b; Takashima et al., 2002). Tdp1 a aussi la capacité de cliver des sites abasiques (Lebedeva et al., 2011), ainsi que d'éliminer des terminaisons bloquantes en position 3' lors de la réparation de dommages de bases et de réparation de cassures simple brin (Interthal et al., 2005a). L'activité de Tdp1 est aussi essentielle dans un contexte d'inhibition de TOP1 par la camptothécine. Dans ce contexte, les adduits TOP1-ADN sont hydrolysés par Tdp1 et PNKP produira une extrémité 3'OH permettant la réparation par le BER (Pour revue : Pommier et al., 2006).

Finalement, l'aprataxine (APTX) est impliquée dans l'hydrolyse des évènements de ligation abortif en 5' qui produisent des groupements adénylés, générant ainsi une extrémité 5'phosphate (Tableau 3). Des mutations insertionelles homozygotes d'*APTX* sont associées avec le syndrome autosomique récessif d'ataxie oculo-motrice de type 1 traduisant l'importance des fonctions de cette protéine (Ahel et al., 2006; Date et al., 2001; Moreira et al., 2001).

Au cours de ces étapes de maturation des extrémités, la protéine XRCC1 joue plusieurs rôles fondamentaux. La présence de XRCC1 accélère la réparation des CSB (Whitehouse et al., 2001). XRCC1 interagit et stimule l'activité d'APE1 *in vitro* (Vidal et al., 2001), interagit avec les protéines APTX et APLF, permettant ainsi leur recrutement au site de dommages et stimulant leur activité (Della-Maria et al., 2012; Iles et al., 2007; Luo et al., 2004). Egalement, XRCC1 interagit avec la protéine PNKP et stimule à la fois son activité kinase et son activité phosphatase (Whitehouse et al., 2001).

1.4 Synthèse d'ADN et jonction des extrémités

Une fois que les deux extrémités d'ADN ont été correctement éditées, la réparation par le BER peut s'effectuer par deux mécanismes : la voie dite du « short-patch » qui consiste en la synthèse d'un nucléotide et le voie dite du « long-patch » qui consiste en la synthèse de deux à douze nucléotides.

La voie du « short patch » dépend de la polymérase β et consiste en la synthèse d'un seul nucléotide permettant de combler la brèche (voir figure 9). Le rôle de cette polymérase est dédié

uniquement à la réparation de l'ADN et ne semble pas impliqué au cours de la réplication (Fortini et al., 1998). Ainsi, la voie du « short patch » est active aussi bien dans des cellules en phase S que dans des cellules quiescentes et semblerait être la voie majoritaire dans nos cellules.

XRCC1 interagit aussi avec la polymérase β dans sa région N-terminale et facilite son recrutement au site de dommage (Kubota et al., 1996b). Cette interaction est aussi importante pour stimuler l'activité du BER. En effet, la mutation V86R qui abolit spécifiquement l'interaction entre XRCC1 et la polymérase β, affecte drastiquement l'efficacité du BER et ainsi la capacité des cellules à survivre en réponse à un stress oxydant (Dianova et al., 2004; Horton et al., 2008; Marintchev et al., 2003). Les extrémités sont alors jointes par l'ADN ligase 3 en complexe avec XRCC1 (Cappelli et al., 1997). A ce stade, la protéine XRCC1 est indispensable car elle régule la stabilité de l'ADN ligase 3 (Caldecott et al., 1995). Néanmoins, des études récentes montrent que le rôle de l'ADN ligase 3 n'est essentiel que dans les mitochondries et que les ADN ligase 1 et 3 sont redondantes dans pour réaliser la ligation dans la voie du « short patch » dans le noyau (Gao et al., 2011; Simsek et al., 2011b). En effet, il a été montré *in vitro* que l'ADN ligase 1 peut réaliser la ligation dans la voie du « short patch » en absence de l'ADN ligase 3. De plus, l'ADN ligase 3 compense pour l'absence de l'ADN ligase 1 *in vivo* (fragment d'Okazaki) (Panier and Durocher, 2013; Sleeth et al., 2004). De façon intéressante, le rôle de l'ADN ligase 3 dans la mitochondrie est indépendant de XRCC1 qui est totalement absent des mitochondries. Ces observations montrent que les fonctions de l'ADN ligase 1 sont complémentées par l'ADN ligase 3, alors que la réciproque n'est pas vraie.

La voie du « long patch » intervient lorsque les extrémités 5'-bloquantes n'ont pas été éliminées. La synthèse d'ADN peut alors se poursuivre en phase S par l'intermédiaire de la machinerie de réplication (Klungland and Lindahl, 1997). Les polymérases δ et ε en complexe avec les cofacteurs RFC et PCNA vont synthétiser de 2 à 12 nucléotides, ce qui va déplacer le brin contenant la lésion générant une structure de type « flap » qui sera clivée par l'endonucléase FEN1 (Flap structure-specific endonuclease 1) (Balakrishnan et al., 2009; Sattler et al., 2003). La ligation sera ensuite dépendante de l'activité de l'ADN ligase 1. Il semble que l'activité PARP favorise la voie du « long patch ». En effet, le recrutement des protéines PCNA et FEN1 est dépendant de PARP1 et de XRCC1, alors que le recrutement des protéines PNKP et POLβ ne semble pas dépendant de l'activité de PARylation (Hanssen-Bauer et al., 2011; Kleppa et al., 2012). De plus,

l'absence de PARP diminue drastiquement l'efficacité de la voie du « long patch » *in vitro* (Dantzer et al., 2000; Prasad et al., 2001). Le rôle de PARP2 n'est pas bien caractérisé dans ces étapes, mais il semble que PARP2 soit majoritairement activé par la présence d'ADN simple brin que l'on retrouve dans les étapes tardives du BER sous la forme de « flaps ». Ceci associé avec l'observation que l'endonucléase FEN1 stimule l'activité de PARP2 *in vitro,* suggère un rôle de PARP2 dans les étapes tardives du BER (Kutuzov et al., 2013a).

Finalement, une étude très récente implique PARP1 en coordination avec l'hélicase RECQ1 (ATP-Dependent DNA Helicase Q1), dans un nouveau mécanisme du « long patch ». Dans cette voie, PARP1 semble recruter l'hélicase RECQ1 qui va catalyser l'ouverture de la double-hélice en 5' de la lésion de base ou de la lésion bloquante. L'action du complexe XPF-ERCC1 produirait alors un « gap » d'environ 9 nucléotides qui sera alors comblé par la machinerie de la réplication (Woodrick et al., 2017). Cependant, l'importance de ce mécanisme *in vivo* reste néanmoins à déterminer.

Les mécanismes responsables du choix entre ces deux sous-voies du BER ne sont pas entièrement compris. Néanmoins, il semble que l'excision des bases par certaines glycosylases comme UNG2 ou NEIL1 favorise l'induction de la voie du « long patch » (Fortini et al., 1999; Hegde et al., 2008b; Otterlei et al., 1999). Ceci est consistant avec l'observation que l'expression de ces deux glycosylases est plus importante en phase S. Ce choix pourrait aussi dépendre du type de dommages et du type cellulaire et de la phase du cycle cellulaire (Akbari et al., 2010; Fortini and Dogliotti, 2007; Narciso et al., 2007; Tichy et al., 2011).

1.5 La protéine XRCC1

La lignée cellulaire EM9 est issue d'un criblage de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) qui avait pour but l'identification de clones sensibles à certains agents génotoxiques (Thompson et al., 1980). Cette lignée présente une sensibilité accrue aux agents alkylants, aux radiations ionisantes, aux UV et une fréquence presque 10 fois supérieure du taux d'échange spontané de chromatides sœurs (SCE) (Thompson et al., 1982). Le gène humain *XRCC1* a été identifié comme capable de complémenter l'hypersensibilité aux agents génotoxiques et la fréquence élevée de SCE de la lignée EM9, impliquant ainsi directement la protéine XRCC1 dans

la prise en charge des lésions de l'ADN (Thompson et al., 1990). En effet, dans cette lignée, l'introduction d'un codon STOP dans le gène *XRCC1*, abolit totalement l'expression endogène de la protéine XRCC1 (Shen et al., 1998). Ainsi, cette lignée cellulaire a été utilisée par de nombreux laboratoire pour étudier les fonctions de XRCC1. Même si la déficience en XRCC1 dans des lignées cellulaires est viable, l'absence de XRCC1 est létale dès le septième jour du développement embryonnaire chez la souris (Tebbs et al., 1999). Les embryons des souris *XRCC1*-/- meurent au même stade du développement que ceux déficients pour l'ADN ligase 3 tout comme ceux déficients pour la protéine APE1 (Puebla-Osorio et al., 2006; Xanthoudakis et al., 1996b). De plus, l'haplo-insuffissance chez la souris est associée avec le développement de lésions pré-cancéreuses dans le colon après exposition à des agents alkylants (McNeill et al., 2011). Néanmoins, la complémentation des souris *XRCC1*-/- qui n'expriment que 10% du niveau de la protéine sont viables et fertiles, indiquant que seule une fraction de la protéine XRCC1 est requise pour assurer un développement embryonnaire correct (Tebbs et al., 2003). Ces observations suggèrent donc que les voies du BER et du SSBR sont cruciales au cours du développement embryonnaire.

1.5.1 Structure de la protéine XRCC1

La protéine XRCC1 est constituée de trois domaines protéiques structurés (le domaine N-terminal et les deux domaines BRCT1 et BRCT2) et de deux domaines non structurés, nommés interdomaines 1 et 2 (voir figure 12). Les résidus 1 jusqu'à 183 forment la région N-terminale de la protéine XRCC1. Cette région est importante car elle interagit avec la polymérase β avec une forte affinité (Caldecott et al., 1996b; Kubota et al., 1996a). Une étude plus récente de cristallographie, a mis en évidence que ce domaine existe sous une forme réduite et sous une forme oxydée. Les deux formes interagissent avec la polymérase β, mais la forme oxydée, caractérisée par la formation d'un point disulfure, présente une affinité plus forte pour la polymérase β. Ceci est cohérant avec un rôle important des deux protéines au sein de la prise en charge des lésions oxydatives (Cuneo and London, 2010). Au cours de la réparation des dommages de bases, cette région est donc importante pour le recrutement de la polymérase β mais aussi pour la stimulation de son activité (Dianova et al., 2004; Petermann et al., 2006). Finalement, la polymérase β est aussi stabilisée via son interaction avec XRCC1 (Parsons et al., 2008). Ce domaine N-terminal de XRCC1 interagit aussi avec la protéine Tdp1. En réponse à un traitement à la camptothécine, il a

été décrit que PARP1 et Tdp1 s'associent pour faciliter le recrutement de XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN. Dans ce contexte, l'interaction entre XRCC1 et Tdp1 est permise par la phosphorylation de Tdp1 en position 81 par les deux kinases ATM (Ataxia telangiectasia mutated) et DNA-PK (DNA-dependent protein kinase, facilitant ainsi la réparation des adduits contenant la topoisomérase 1 (Das et al., 2009; Das et al., 2014; Plo et al., 2003).

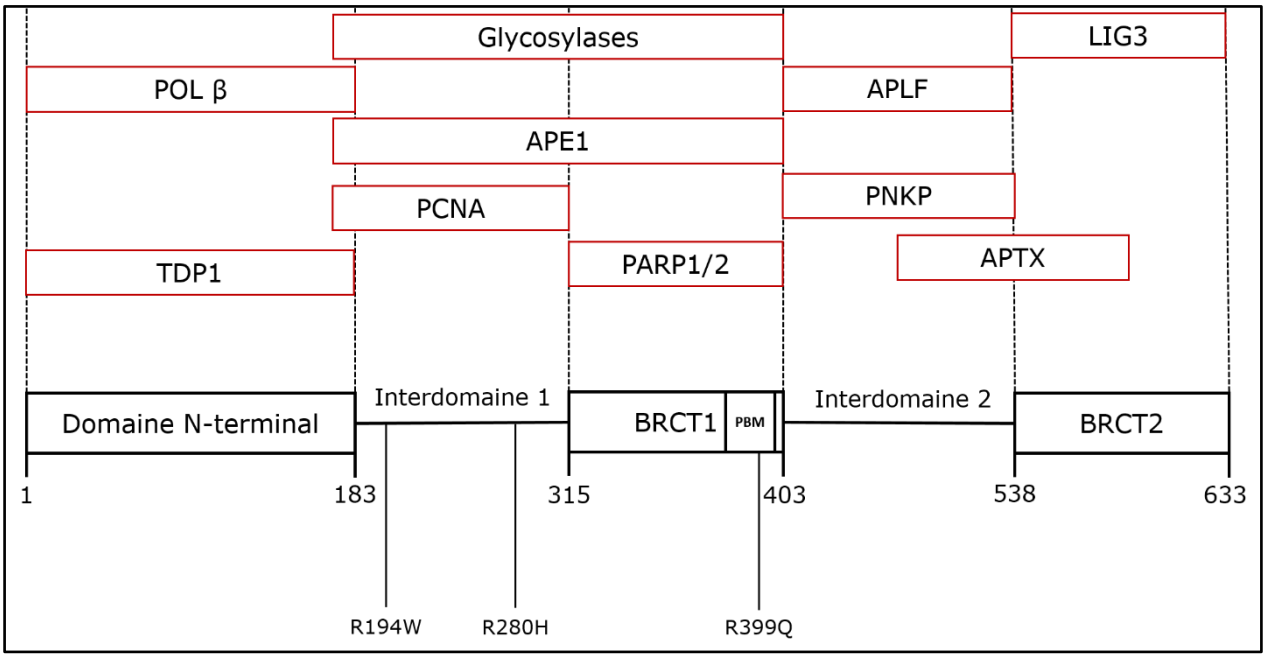


Figure 12 : Structure et partenaires de la protéine XRCC1. La protéine XRCC1 est une protéine de 633 acides aminés (représenté aux extrémités de la protéine). Les trois domaines structurés (N-terminal, BRCT1 et BRCT2) sont représentés par des rectangles alors que les deux domaines non structurés (Interdomaine 1 et Interdomaine 2) sont représentés par une ligne horizontale. Les trois polymorphismes majeurs de XRCC1 et présents dans la séquence codante sont indiqués en dessous. Finalement, les différents partenaires de XRCC1 ainsi que leur domaines d'interactions connus sont représentés par des rectangles rouges sur le dessus. R : Arginine, W : Tryptophane, H : Histidine, Q : Glutamine.

L'interdomaine 1 est une région non structurée de la protéine XRCC1 allant des acides aminés en position 183 à 315 (voir figure 12). Malgré l'absence de structure bien définie, cette région est essentielle pour les fonctions protéiques de XRCC1. Tout d'abord, on notera la présence du signal de localisation nucléaire de XRCC1 entre les résidus 239 à 266 (Masson et al., 1998b). Les résidus 166 à 310 sont importants pour l'interaction de XRCC1 avec la protéine PCNA, une protéine essentielle pour assurer la processivité des polymérases au cours de la réplication et aussi

pour coordonner l'action d'enzymes de la réparation telles que les polymérase translésionnelles et des protéines de la réparation des mésappariements de l'ADN (Fan et al., 2004; Gilljam et al., 2009). Cette interaction est intrigante car cette région de XRCC1 ne contient aucun des domaines canoniques permettant une interaction avec PCNA (Gilljam et al., 2009), mais elle est néanmoins essentielle pour assurer les fonctions de XRCC1 dans la voie du « long patch ».

La région BRCT1 de XRCC1 correspond aux acides aminés 315 à 403 (voir figure 12). Les domaines BRCT, caractérisés pour leur homologie avec les domaines en C-terminal de BRCA1, sont hautement conservés évolutivement et sont présents au sein de nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Pour revue : Bork et al., 1997; Leung and Glover, 2011). La région BRCT1 est probablement le domaine le plus critique pour assurer les fonctions multiples de XRCC1. En effet, l'introduction de mutations ponctuelles au sein du domaine BRCT1 sensibilise très fortement les cellules CHO aux agents alkylants et conduisent à une accumulation de CSB plus de 20 fois supérieure aux cellules sauvages dans toutes les phases du cycle cellulaire (Breslin et al., 2015; Okano et al., 2003; Taylor et al., 2002). Cet effet est aussi drastique que ce qui est observé dans les cellules EM9 qui n'expriment pas XRCC1, renforçant ainsi le rôle critique de ce domaine dans les fonctions de XRCC1. De même, la complémentation des cellules EM9 avec les formes mutées du domaine BRCT1 ne restaure pas la viabilité cellulaire en réponse aux agents alkylants. De plus, les mutations du BRCT1 sont associées avec un défaut de redémarrage des fourches de réplication en réponse aux dommages de l'ADN (Kubota and Horiuchi, 2003; Taylor et al., 2002).

L'importance du domaine BRCT1 dans les fonctions de XRCC1 s'explique par son importance pour assurer le recrutement de XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN. En effet, ce domaine, interagit non seulement avec les PAR, mais aussi avec les protéines PARP1 et PARP2 (Masson et al., 1998b; Schreiber et al., 2002). En réponse à l'induction de CSB, l'activation de PARP1 et PARP2 conduit à la synthèse de PAR qui vont permettre le recrutement de XRCC1 (aussi voir page 59) (Hanzlikova et al., 2017; Mortusewicz et al., 2007). La reconnaissance des polymères d'ADP-ribose par XRCC1 est probablement permise par le domaine PBM en position 379 à 400 ou par le domaine BRCT1 dans sa totalité (Li et al., 2013; Pleschke et al., 2000a). De plus, de nombreux sites de la protéine XRCC1 sont PARylés par PARP1 et PARP2 en réponse aux dommages de l'ADN, mais la fonction de ces modifications n'est pas caractérisée à ce jour (Carter-

O'Connell et al., 2014; Chiou et al., 2012; Daniels et al., 2014; Gibson et al., 2016; Jungmichel et al., 2013a; Schreiber et al., 2002; Zhang et al., 2013a).

La région BRCT1 mais aussi l'interdomaine 1 semblent essentiels pour faciliter l'interaction de XRCC1 avec la protéine APE1 mais aussi avec les glycosylases OGG1, NEIL1, NEIL2, MPG et NTH1. *In vitro*, XRCC1 stimule l'activité de toutes ces protéines mettant ainsi en lumière le rôle crucial de XRCC1 au sein de la détection des dommages de bases (Campalans et al., 2005; Marsin et al., 2003; Vidal et al., 2001).

L'interdomaine 2 est une seconde région non structurée de 125 résidus située entre les deux domaines BRCT de XRCC1. Cette région est hautement modifiée par phosphorylation et nous en discuterons par la suite. La principale kinase responsable de ces phosphorylations est la caséine kinase 2 (CK2). En réponse aux dommages de l'ADN, il a été montré que CK2 phosphoryle l'interdomaine 2 de XRCC1, permettant ainsi l'interaction spécifique de ce domaine avec les protéines PNKP et APTX (Ali et al., 2009; Becherel et al., 2010; Loizou et al., 2004; Luo et al., 2004). Cette interaction stimule l'activité de PNKP et d'APTX et est nécessaire pour assurer une réparation efficace des CSBs. De même, la mutation des sites de phosphorylation de CK2 sur XRCC1 diminue le recrutement de PNKP et d'APTX aux sites de dommages de l'ADN et affecte l'efficacité de réparation des CSBs.

Finalement, le domaine BRCT2 est le domaine critique pour l'interaction entre XRCC1 et l'ADN ligase 3 (voir figure 12) (Caldecott et al., 1995; Taylor et al., 1998). L'interaction de XRCC1 avec l'ADN ligase 3 est essentielle pour stabiliser cette dernière. Ce dernier n'est pas aussi bien conservé que le domaine BRCT1 avec lequel il présente peu d'homologie (Zhang et al., 1998). De façon intéressante, la mutation du domaine BRCT2 ralentit la vitesse de réparation des dommages en phase S-G2, mais n'affecte pas la survie des cellules en réponse à un traitement avec des agents alkylants. En revanche, il est nécessaire pour assurer la survie cellulaire dans des cellules quiescentes (Moore et al., 2000; Taylor et al., 2000) indiquant que l'expression de l'ADN ligase 3 n'est pas le facteur majoritaire de l'efficacité de réparation des CSB au cours de la phase S et G2 du cycle cellulaire. Ceci est cohérent avec les évidences récentes que l'ADN ligase 1 est la ligase majoritaire au sein des deux sous-voies du BER ou avec l'activation de la voie du « long patch » durant les phase réplicatives (Simsek et al., 2011b).

1.5.2 XRCC1 et cancer

1) Les polymorphismes de XRCC1

Les variations inter-individuelles les plus fréquemment observées au sein du génome sont les SNPs (single-nucleotide polymorphisms). Ces modifications sont retrouvées tous les 100 à 300 paires de bases et correspondent à la modification d'une base pouvant parfois conduire à la substitution d'un acide aminé. Ces variations sont évidemment héritables et ségrégent dans la population. Ainsi, certains polymorphismes peuvent être largement surreprésentés dans certaines régions géographiques ou certaines populations ethniques.

Même si la protéine XRCC1 ne possède pas d'activité enzymatique propre, son rôle crucial dans la réparation de l'ADN en fait un acteur majeur de la prévention de l'instabilité génétique et de la transformation tumorale. Au sein du gène codant pour la protéine XRCC1, une soixantaine de SNPs ont été identifiés à ce jour dont une trentaine uniquement dans la région codante et dans la région promotrice (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). Parmi ces SNPs, quatre sont fréquemment représentés au sein de la population et ont été particulièrement étudiés pour leur association avec le risque de développement de cancers. Trois sont présents dans la séquence codante du gène *XRCC1* et conduisent à la formation de variants de la protéine XRCC1 (voir figure 12) et un dernier est localisé dans le 5'UTR, soit la région promotrice en amont.

- En 2004, l'allèle -77(T>C) présent au sein de la région promotrice de XRCC1 a été associé pour la première fois avec un risque plus accrue de développer un carcinome de l'œsophage au sein d'une cohorte chinoise (Hao et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que ce polymorphisme est présent au sein de la région de liaison à l'ADN du facteur de transcription SP1 (Hao et al., 2006). La présence des allèles CT ou CC augmentent fortement l'affinité de SP1 pour le promoteur de *XRCC1*. Par des essais d'activité luciférase, il a été déterminé que ceci avait pour conséquence de diminuer fortement l'activité transcriptionnelle du gène *XRCC1*, conduisant ainsi à une diminution de l'abondance de la protéine du même nom. Ce polymorphisme a depuis été associé avec un risque accrue de développer un cancer du poumon et aussi de l'œsophage (Corso et al., 2009; Hao et al., 2004). Ces observations indiquent que l'expression de XRCC1 contribue

directement à prévenir l'émergence de certains cancers en maintenant la stabilité du génome.

- Le variant R194W (Arginine > Tryptophane) est causé par un polymorphisme C vers T localisé dans l'exon 6 du gène *XRCC1*. Il semblerait que ce polymorphisme puisse être retrouvé dans presque 15 pour cent de la population globale (Ladiges et al., 2003). Les analyses de l'association de ce polymorphisme avec le risque de développement de cancers a produit des résultats largement contradictoires avec tantôt un effet protecteur et parfois un effet sensibilisateur (Feng et al., 2014; Goode et al., 2002; Zhou et al., 2014a). Dans les lignées de hamster déficientes pour XRCC1, l'introduction de ce variant de la protéine XRCC1 restaure la sensibilité à différent agents génotoxiques au même niveau que la lignée parentale sauvage pour XRCC1, suggérant ainsi une capacité normale de la protéine à réparer les dommages de l'ADN (Takanami et al., 2005). De plus, dans ces mêmes lignées cellulaires ainsi qu'au sein de la lignée HeLa, la présence de ce variant n'affecte pas l'interaction de XRCC1 avec ses partenaires protéiques, ni son recrutement au site de dommage de l'ADN induit par microirradiation laser (Berquist et al., 2010b). Pourtant, une étude récente indique que le variant R194W produit un défaut d'interaction entre XRCC1 et la glycosylase OGG1 (Campalans et al., 2015). Cette étude présente aussi un défaut de recrutement de l'ADN ligase 3 aux sites de dommages de base et une accumulation de micronoyaux après un traitement au bromate de potassium, puissant agent oxydant, associés avec la présence de ce variant. Néanmoins, les cinétiques de réparation des CSBs et des dommages de base ne sont pas impactées. L'effet fonctionnel de ce variant reste donc lui aussi incertain, même s'il pourrait être associé avec un défaut de réparation de certains dommages de bases spécifiques.

- Le variant R280H (Arginine > Histidine) est causé par une transition G vers A dans l'exon 9 du gène *XRCC1*. Ce variant est présent dans environ sept pour cent de la population (Ladiges et al., 2003). La susceptibilité au cancer associée avec la présence de ce variant reste encore incertaine. Néanmoins, certaines méta-analyses semblent indiquer une susceptibilité accrue au développement de cancers de la vessie, du système digestif, du sein ou encore du foie en association avec la présence du variant R280H (Li et al., 2009; Liu et

al., 2013; Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2013c). Au niveau fonctionnel, la présence de ce variant a été associée avec une sensibilité cellulaire plus importante à la bléomycine (Tuimala et al., 2002). De plus, la complémentation des lignées déficientes pour XRCC1 avec une protéine porteuse de ce variant ne restaure que partiellement la sensibilité au MMS et conduit à une cinétique plus lente de la réparation des CSBs (Takanami et al., 2005). Plus récemment, il a été montré le polymorphisme R280H réduisait l'accumulation de la protéine XRCC1 aux sites de micro-irradiation laser et qu'il conduisait à l'accumulation de cassures double-brins de l'ADN en réponse à des agents alkylants dans des lignées cellulaires (Berquist et al., 2010b; Sizova et al., 2015). Ces études fonctionnelles indiquent clairement un effet néfaste de ce polymorphisme sur les fonctions de XRCC1 dans la réparation. Il est intéressant de noter que ce polymorphisme, présent dans l'interdomaine 1 de XRCC1 (voir Figure 12), impacte le recrutement de XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN. Ceci pourrait suggérer un rôle de ce domaine dans la reconnaissance de PAR ou des dommages de l'ADN.

- Finalement, le variant R399Q (Arginine > Glutamine), situé dans l'exon 10 de *XRCC1* (G > A) est probablement le plus représenté dans la population. Les études épidémiologiques ont produit de nombreux résultats contradictoires concernant ce variant (Hung et al., 2005; Ladiges, 2006; Qin et al., 2015; Tudek, 2007). Il est fort probable que les différences dans le choix et la taille des cohortes prises en considération soient à l'origine de ces divergences. Une observation intéressante indique cependant que la présence de ce polymorphisme puisse être associée avec un risque plus élevé de l'apparition d'effets secondaires de la radiothérapie (Zhou et al., 2014b). Cette observation a été rapportée pour de nombreux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Pour revue : Rosenstein, 2011). Les études fonctionnelles ont mis en évidence que ce variant n'affecte pas (1) l'interaction de XRCC1 avec ces partenaires protéiques majeurs, (2) sa localisation cellulaire, (3) son recrutement aux sites de dommages induits par micro-irradiation laser (Berquist et al., 2010a). Au niveau de la sensibilité cellulaire aux dommages de l'ADN, ces études ont donné lieu à des résultats largement contradictoires. Tantôt, la présence du variant R399Q facilite la survie cellulaire, alors que parfois il conduit à une instabilité génétique et à la mort cellulaire par apoptose (Aka et al., 2004; Cornetta et al., 2006; Godderis et al., 2006; Rzeszowska-Wolny

et al., 2005). Il est possible que ces divergences proviennent des différents agents génotoxiques et méthodologies utilisés par ces équipes.

Ainsi, excepté pour le variant R280H et dans un moindre mesure, l'allèle -77(T>C), l'impact de ces polymorphismes est incertain ou négligeable. Ces différents polymorphismes étant fortement représentés dans la population globale, il est en effet difficile d'imaginer qu'un impact drastique de ces polymorphismes n'ait pas été sélectionné négativement au cours de l'évolution.

2) L'expression de XRCC1

L'analyse de l'expression de XRCC1 dans les cellules cancéreuses montre qu'une surexpression de la protéine ou une augmentation du niveau d'ARN messager est associée avec un mauvais pronostic vital dans de nombreux cancers (Abdel-Fatah et al., 2013; Ang et al., 2011; Zhang et al., 2017). En effet, la surexpression de XRCC1 conduit à une résistance des cellules tumorales aux agents de chimiothérapie comme le cisplatine ou à la radiothérapie ce qui pourrait expliquer le mauvais pronostic associé à ce marqueur (Abdel-Fatah et al., 2013; Zhang et al., 2010). De même, il a été observé que la surexpression de XRCC1 est associée avec l'émergence de clones de cellules tumorales résistantes à un traitement à la camptothécine (Park et al., 2002). Ainsi, le développement tumoral est probablement associé avec une augmentation de l'expression de XRCC1. Les variations directes de l'expression de XRCC1 chez les patients en réponse aux traitements anticancéreux ne sont en revanche pas caractérisées.

A l'inverse, l'expression de XRCC1 dans les cancers de l'estomac est fréquemment diminuée par méthylation de son promoteur (Wang et al., 2010) et la diminution de l'expression de XRCC1 est associée avec une diminution de la survie globale (Wang et al., 2012a). Il semble aussi que la protéine XRCC1 soit dégradée par ubiquitinylation dans ce modèle tumoral (Xu et al., 2014b). De façon intéressante, l'absence de XRCC1 est associée avec une sensibilité importante au cisplatine dans ce contexte, ouvrant la voie à des nouvelles pistes thérapeutiques. Finalement, une diminution de l'expression de XRCC1 chez les patientes pourrait être associée avec un risque plus important de développer des effets secondaires suite à la radiothérapie mammaire (Batar et al., 2016). Ainsi, l'analyse de l'expression tumorale de XRCC1 semble pouvoir être utilisée comme un biomarqueur

de risque de développement tumorales et également comme un marqueur prédictif de réponse à des thérapies anticancéreuses.

2. Les PARPs et la réparation des cassures double-brins de l'ADN

Les cassures double-brins (CDBs) constituent probablement l'une des lésions les plus toxiques pour nos cellules. Ce type de lésions consiste en une double interruption du squelette ribose-phosphate de l'ADN suffisante pour induire une dissociation physique de la double-hélice d'ADN. Les CDBs peuvent provenir de l'exposition à des agents agents alkylants comme le MMS ou le temozolomide, à des agents formant des pontages à l'ADN comme le cisplatine ou la mitomycine C, à des drogues radiomimétiques comme la bléomycine ou la phléomycine ou aux radiations ionisantes. Les inhibiteurs de topoisomérases comme la camptothécine ou l'étoposide peuvent aussi induire des CSBs et des CDBs. Finalement, le blocage de la réplication avec des drogues comme l'hydroxyurée ou l'aphidicoline peut produire indirectement des CDBs.

Les CDBs peuvent aussi émerger lors de différents processus biologiques. Dans les cellules humaines, il a été estimé qu'environ 1% des CSBs peut être convertie en CDBs, ce qui représente environ 50 CDBs par cellule et par cycle cellulaire et correspond à une fréquence de 10^{-8} par paire de bases (Vilenchik and Knudson, 2003). Il s'agit probablement d'une surestimation car le marqueur utilisé lors de cette étude (phosphorylation de la sérine 139 du variant d'histone H2AX) n'est pas totalement spécifique des CDBs (Soutoglou and Misteli, 2008; Valdiglesias et al., 2013). L'origine de ces dommages est majoritairement associée avec la réplication de l'ADN (Pour revue : Syeda et al., 2014). En effet, des collisions entre la machinerie de transcription et celle de la réplication ou une rencontre entre une CSB et la machinerie de réplication peuvent se produire, pouvant ainsi conduire à la formation de CDBs spontanées. On peut citer comme exemple les hybridations de l'ARN et de l'ADN qui produisent des structures nommées « R-loops ». Ces structures sont à l'origine d'évènements de recombinaison pouvant conduire à de l'instabilité génétique (Huertas and Aguilera, 2003; Prado and Aguilera, 2005). De plus, certains programmes développementaux requièrent la formation contrôlée de CDBs. On peut par exemple citer la recombinaison V(D)J permettant l'assemblage et la diversité des récepteurs aux antigènes des

lymphocytes B et T ou la commutation de classe (CSR) et l'hypermutation somatique au cours de la différenciation terminale des lymphocytes B. Au cours de ces différents processus, l'induction de l'expression d'une endonucléase ou de la déaminase AID (Activation-induced cytidine deaminase) reconnaissant des régions spécifiques de l'ADN, va produire plusieurs centaines de CDBs. La réparation de ces CDBs sera à l'origine d'une diversité génétique incroyable, nécessaire au bon fonctionnement de l'immunité adaptative (Pour revue : Soulas-Sprauel et al., 2007). Ces processus d'induction contrôlés de CDBs se retrouvent aussi au cours de la méiose ou lors de la reproduction sexuée chez la levure (Pour revue : Haber, 2012; Lam and Keeney, 2014).

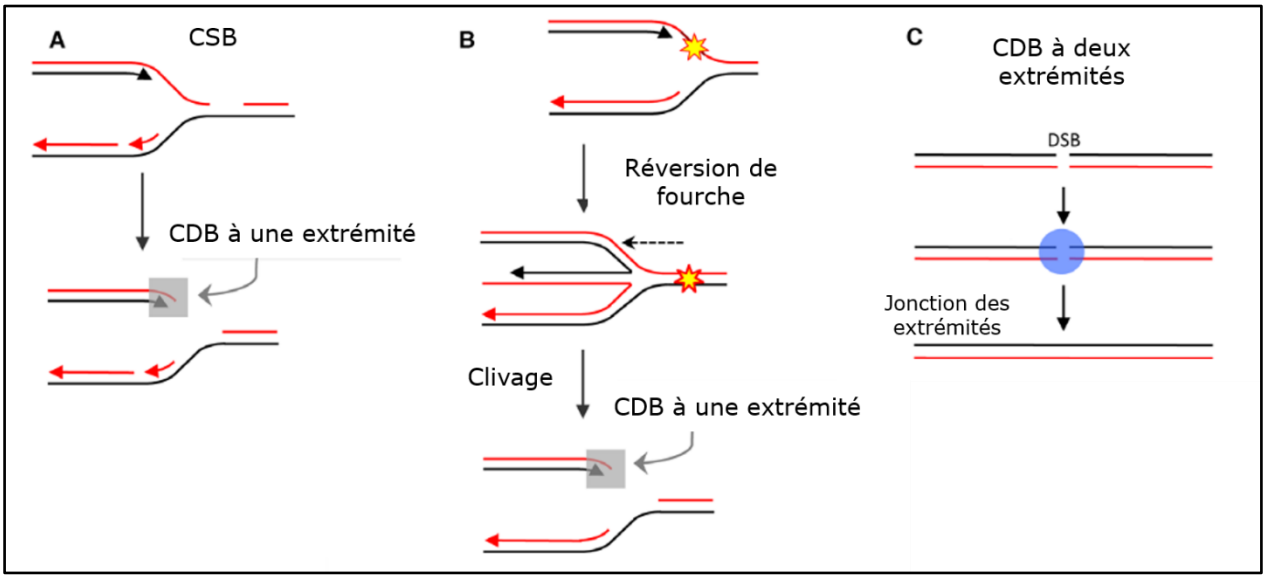


Figure 13 : Les types de cassures doubles-brins de l'ADN. Lorsqu'une fourche de réplication rencontre une CSB ou un « gap », il y aura production d'une CDB à une extrémité (A). Si la fourche rencontre une lésion bloquante (étoile jaune), il peut y avoir réversion de la fourche et formation d'une structure cruciforme nommée en « pied de poule ». Le clivage au niveau de la lésion ou de la jonction en « pied de poule » produit directement ensuite une CDB à une extrémité (B). Lors de la formation d'une CDB à deux extrémités par une endonucléase ou les radiations ionisantes, les deux extrémités peuvent être maintenues ensemble par des complexes protéiques : étape dite de « tethering » (C) (Figure adaptée de So et al., 2017).

En fonction de leurs origines, les CDBs peuvent se distinguer en deux catégories. La première correspond aux CDBs à une seule extrémité dont l'origine est réplicative. Lorsque la fourche de réplication rencontre une CSB ou un adduit, il peut y avoir formation de ce type de lésion directement ou après une étape de réversion de fourche (voir figure 13). Les agents alkylants, les inhibiteurs de topoisomérases et les inhibiteurs de la réplication produisent majoritairement des

CDBs à une extrémité. La seconde correspond aux CDBs à deux extrémités, des lésions qui sont majoritairement causées par l'action des endonucléases, des radiations ionisantes ou encore des drogues radiomimétiques (voir figure 13).

La prise en charge correcte des CDBs est essentielle car leur persistance peut conduire à l'induction de la mort cellulaire par apoptose ou à la sénescence. De même, des défauts dans la prise en charge des CDBs favorise l'instabilité génétique et peut être responsable de délétions ou de duplications de régions du génome ou même favorise l'émergence de translocation que l'on retrouve fréquemment au sein des cellules tumorales. Cette notion sera discutée par la suite, mais il est intéressant de noter dès maintenant que certains des évènements de réparation des CDBs ne sont pas conservatifs.

Il existe quatre voies majoritaires de la réparation des CDBs de l'ADN : Les voies canonique et alternative de jonction des extrémités, la voie de la recombinaison homologue et enfin la voie du « single-strand annealing ». Dans cette partie, je détaillerais le mécanisme moléculaire de chacune de ces voies ainsi que les fonctions connues de PARP1, PARP2 et PARP3 dans ces processus biologiques. Je m'attarderais aussi particulièrement sur l'étape nommée résection, qui permet la formation d'ADN simple-brin de part et d'autre d'une CDB de l'ADN, et qui est partiellement communes aux voies de la recombinaison homologue, du « single-strand annealiing » et de la jonction alternative des extrémités.

2.1 La voie canonique de jonction des extrémités

La voie canonique de jonction des extrémités ou C-EJ est la voie de réparation des CDBs la plus active dans les cellules humaines. Comme cette voie de la réparation ne nécessite pas de séquences homologues pour promouvoir la réparation des CDBs, elle peut opérer en phase G1 du cycle cellulaire contrairement à la voie de la recombinaison homologue qui est restreinte aux phases S et G2 du cycle cellulaire (voir page 87), et peut donc opérer tout au long du cycle cellulaire. Le mécanisme moléculaire régissant cette voie de réparation semble extrêmement simple et peut se résumer en quatre étapes principales (voir figure 14) :

- La reconnaissance des extrémités de la CDB et l'assemblage du complexe de réparation
- Le maintien des deux extrémités d'ADN
- La maturation des extrémités pour permettre la ligation
- La ligation des deux extrémités et le désassemblage du complexe de réparation

2.1.1 La reconnaissance des extrémités

L'étape initiale de la voie du C-EJ est le recrutement de l'hétéro-dimère Ku au site de CDB (Mari et al., 2006; Uematsu et al., 2007b). L'hétéro-dimère Ku est composé des deux protéines Ku70 et Ku80. Même si la séquence de ces deux protéines diverge, leurs domaines fonctionnels ainsi que leurs structures sont très bien conservés. En position N-terminale, le domaine von Willebrand (vWA) ainsi que le domaine Ku central est à l'origine de l'hétéro-dimérisation des deux protéines alors que la région C-terminale contient la région de liaison à l'ADN (domaine SAP) (Walker et al., 2001b; Zhang et al., 2001).

Il semblerait que seulement deux molécules de Ku soient présentes à chaque CDB (Britton et al., 2013). L'hétéro-dimère Ku est recruté en quelques secondes au site de micro-irradiation laser ce qui est probablement dû à son affinité extraordinaire pour les extrémités d'ADN libres avec une constante d'affinité de l'ordre de 10^{-9} M (Blier et al., 1993; Mari et al., 2006). La structure cristallographique du complexe révèle que l'hétéro-dimère Ku reconnait le squelette de sucre de l'ADN et non les bases, ce qui explique pourquoi l'hétéro-dimère ne reconnaît pas une séquence spécifique de l'ADN (Walker et al., 2001a). Une fois fixé sur l'ADN l'hétéro-dimère Ku servira de plateforme pour le recrutement des autres acteurs de la voie du C-EJ.

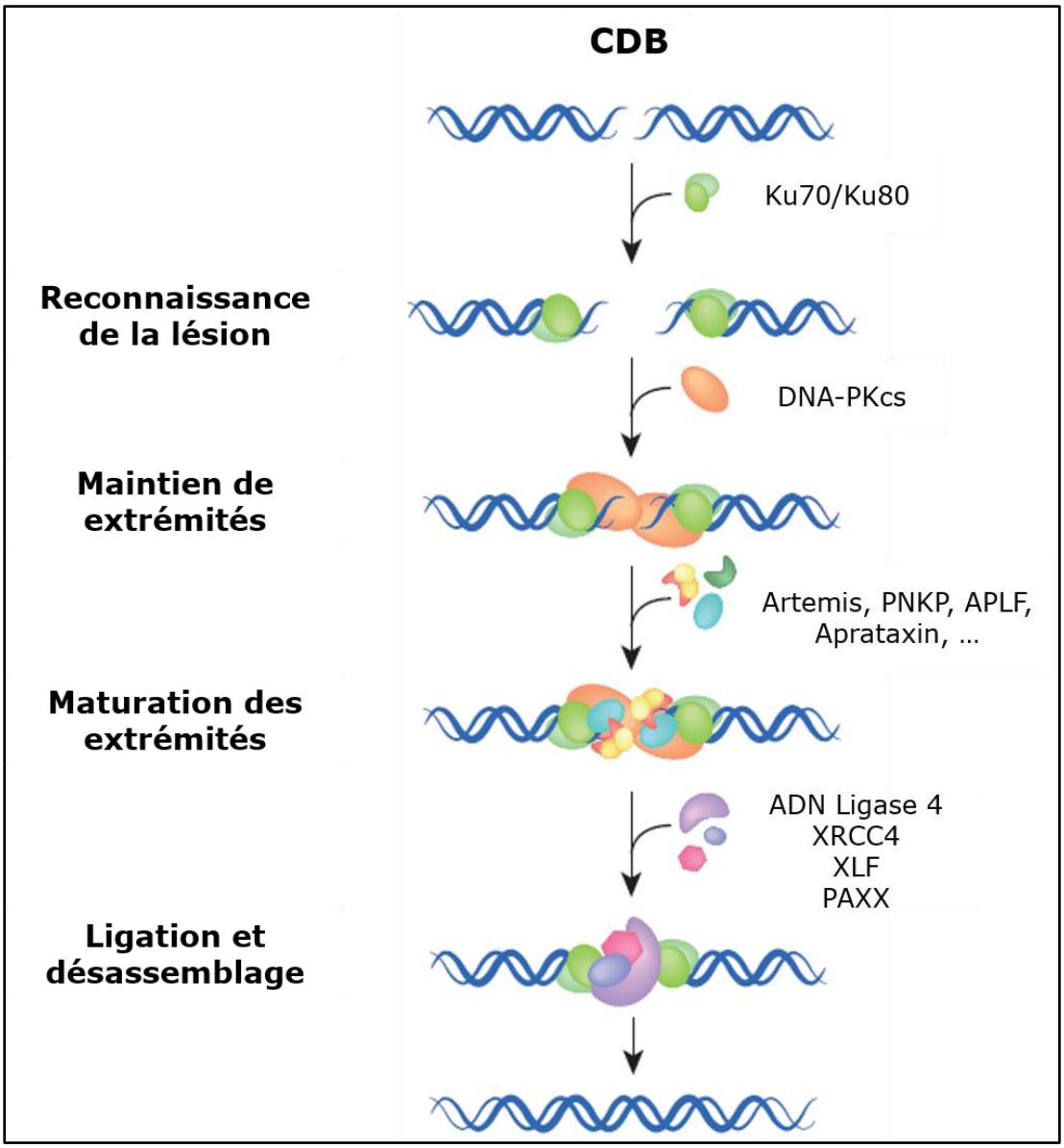


Figure 14 : Les principales étapes de la voie canonique de jonction des extrémités. En réponse à l'induction d'une CDB, l'hétérodimère Ku70/Ku80 est presque immédiatement recruté au site de dommage de l'ADN. La sous unité catalytique DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) est recrutée par la suite formant l'holoenzyme active DNA-PK. La maturation des extrémités est permise par de nombreuses hélicases et nucléases comme les protéines PNKP, APLF et Aprataxin, précédemment décrites et par l'endo- et exonucléase Artemis. Cette étape permettra la synthèse d'extrémités 5'phosphate et 3'hydroxyl nécessaire pour la ligation. L'étape de ligation dépend ensuite exclusivement de l'ADN ligase 4 en complexe avec la protéine XRCC4.

L'une de ces protéines de la voie du C-EJ qui a été la plus étudiée est la protéine DNA-PKcs, une kinase membre de la famille des phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase-like kinase (PIKK). Le recrutement de DNA-PKcs au sein de l'hétéro-dimère Ku formera l'holoenzyme DNA-

PK (Gottlieb and Jackson, 1993). Cette famille de kinases comprend aussi les kinases ATM (ataxia-telangiectasia mutated) et ATR (ATM and Rad3- related). Dans leur partie N-terminale, les kinases de type PIKK contiennent des répétitions de domaines HEAT (Huntington-elongation-A-subunit-TOR) servant d'interface pour des interactions protéines-protéines (Sibanda et al., 2010). La région N-terminale de DNA-PKcs contient un domaine en glissière à leucine lui accordant ainsi une forte affinité pour l'ADN (Gupta and Meek, 2005). Finalement, la région C-terminale contient le domaine kinase. Les études structurelles indiquent que DNA-PKcs adopte une conformation en forme de pince interagissant à la fois avec les extrémités d'ADN et avec l'hétéro-dimère Ku (Sibanda et al., 2010). De même, l'hétéro-dimère Ku semble présenter des contacts multiples avec DNA-PKcs permettant ainsi la formation d'un complexe très stable (Falck et al., 2005; Rivera-Calzada et al., 2007; Spagnolo et al., 2006). Même si DNA-PKcs a été impliquée dans d'autres processus biologiques, il semble que son activité kinase en dehors de l'hétéro-dimère Ku soit extrêmement limitée, voire absente *in vitro* (Hammarsten and Chu, 1998). Une fois activé, DNA-PKcs s'autophosphoryle au sein d'un cluster qui est maintenant bien caractérisé mais cible aussi la sérine 139 de l'histone H2AX (Chan et al., 2002; Stiff et al., 2004).

Le complexe XRCC4-ADN ligase 4 est aussi recruté aux sites de dommages par l'hétéro-dimère Ku (Mari et al., 2006; Nick McElhinny et al., 2000). XRCC4 interagit physiquement avec la sous-unité Ku70 alors que l'ADN ligase 4 interagit avec l'hétéro-dimère Ku via ses domaines BRCT (Costantini et al., 2007; Hsu et al., 2002). Finalement, tous les autres acteurs du complexe du C-EJ semblent être recrutés via leur interaction avec l'hétéro-dimère Ku ou avec la protéine XRCC4 (voir figure 15).

- La protéine XLF (XRCC4-like factor) interagit avec l'hétéro-dimère Ku de façon dépendante de l'ADN (Yano et al., 2008).
- La nucléase APLF reconnait le domaine vWA de Ku80 (Grundy et al., 2013).
- L'hélicase et nucléase Werner (WRN) de la famille des RecQ hélicase interagit avec XRCC4 et Ku, ce qui stimule son activité nucléase (Cooper et al., 2000; Kusumoto et al., 2008).
- Les protéines PNKP et Aprataxine sont recrutées aux sites de dommages grâce à leurs domaines FHA qui semble reconnaitre une forme phosphorylée de XRCC4 par la kinase CK2. Cette observation est similaire de ce qui a été décrit pour leurs interactions respectives

avec XRCC1 au cours du BER. (Clements et al., 2004b; Koch et al., 2004; Mani et al., 2010; Zolner et al., 2011).

- Finalement la protéine PAXX (Paralog of XRCC4 and XLF), récemment identifiée, reconnait la sous-unité Ku70 (Ochi et al., 2015; Tadi et al., 2016b).

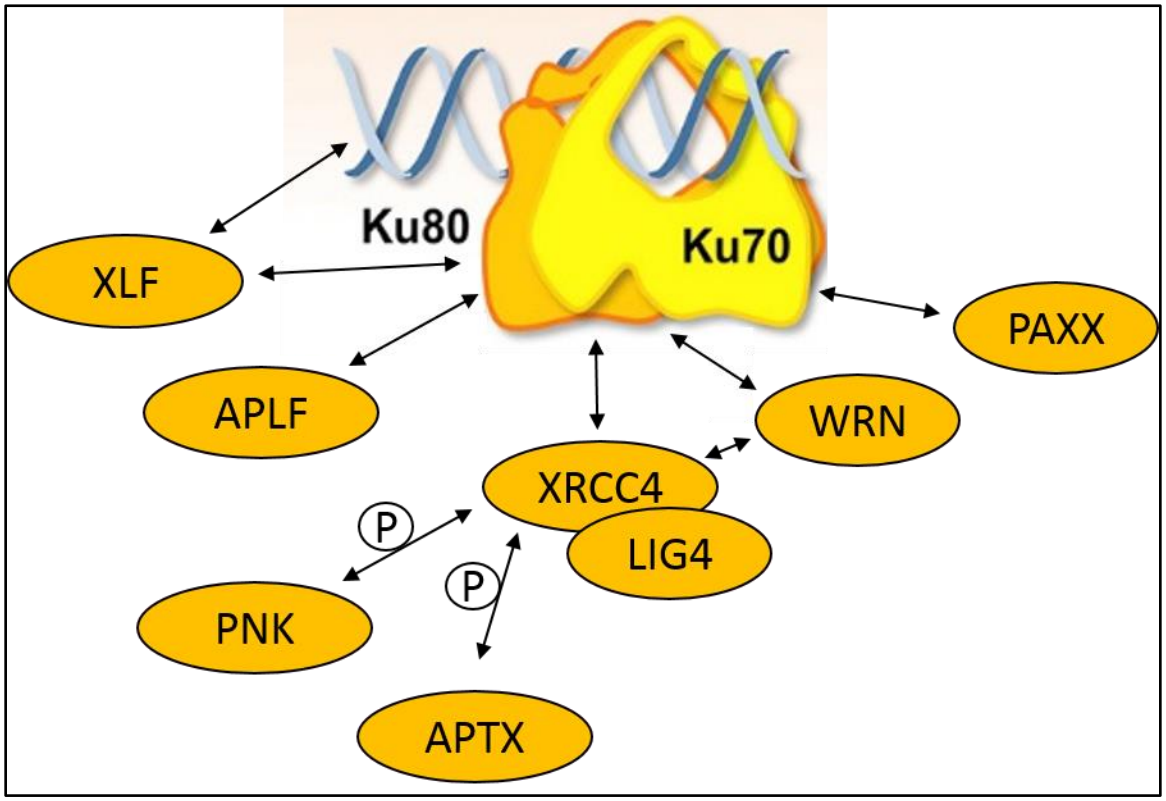


Figure 15 : L'assemblage du complexe de réparation des CDBs par jonction canonique des extrémités. Les flèches indiquent les interactions respectives permettant le recrutement des acteurs de la voie du C-EJ. La lettre P indique que l'interaction est phospho-dépendante (Figure adaptée de Tadi et al., 2016b).

Ainsi l'hétéro-dimère Ku et XRCC4 sont indispensables à l'assemblage rapide du complexe de réparation de la voie du C-EJ (voir figure 15). En revanche la présence de DNA-PKcs n'est pas requise pour l'accumulation de XRCC4, de l'ADN ligase 4 ou encore de XLF (Mari et al., 2006).

2.1.2 Protection et maintien des extrémités

Lors de formation d'une CDB, l'hétéro-dimère Ku se lie en quelques secondes aux extrémités d'ADN avec une très forte affinité. La présence de Ku aux extrémités va protéger l'ADN de la dégradation par les multiples exonucléases présentent au sein du noyau. Par microscopie, il a par exemple été observé que Ku est suffisant pour joindre ensemble deux extrémités d'ADN plasmidique *in vitro* (Pang et al., 1997). Cette étape est critique dans le maintien des extrémités et de la stabilité du génome et est conservée tout au long du cycle cellulaire. En effet, Ku se lie aux extrémités d'ADN quelle que soit la phase du cycle cellulaire (Shao et al., 2012). La présence de DNA-PKcs modifie aussi la structure du complexe favorisant ainsi le maintien de la synapse (Hammel et al., 2010b).

Les protéines XRCC4 et XLF sont aussi essentielles dans le maintien des extrémités. Par microscopie, plusieurs équipes de recherche ont observé que les protéines XRCC4 et XLF s'arrangeaient ensemble sous la forme de filaments hélicoïdaux. (Andres et al., 2012; Hammel et al., 2010a; Mahaney et al., 2013). Ces deux protéines présentent un domaine formant une tête globulaire qui est essentiel pour l'interaction entre XLF et XRCC4 ainsi que pour la formation de ces filaments. Il semblerait que la formation de ces filaments soit essentielle pour aligner les deux extrémités d'ADN l'une en face de l'autre, mais aussi pour maintenir les deux extrémités ensembles. En effet, les différents modèles proposent que l'ADN aux extrémités soit présent au sein de la région tubulaire de ce super filament, ou qu'il pourrait s'enrouler autour, protégeant et stabilisant en même temps l'ADN. Une étude récente propose ainsi une synapse des extrémités en deux étapes. Tout d'abord, la formation d'un large complexe comprenant DNA-PK, puis le rapprochement et l'alignement des extrémités de façon dépendante de XRCC4-LIG4 et de l'activité catalytique de DNA-PKcs (Graham et al., 2016).

2.1.3 La maturation des extrémités

Une extrémité 5'phosphate et l'autre 3'hydroxyl aux deux extrémités d'ADN sont requises afin de permettre l'action de l'ADN ligase 4. Une étape de maturation est donc souvent nécessaire a formation de telles extrémités et de multiples enzymes sont impliquées au cours de cette étape.

Comme pour la voie du BER, présentée précédemment, on retrouve ainsi l'activité kinase et phosphatase de la protéine PNKP qui peut phosphoryler une extrémité 5'OH et hydrolyser une extrémité 3'phosphate laissant ainsi un groupement hydroxyl (Bernstein et al., 2005). De même l'action de l'aprataxine élimine les groupements adénylés liés de façon covalente à l'extrémité 5'phosphate, comme au sein de la voie du BER (Ahel et al., 2006). L'activité de la protéine Artemis est aussi essentielle en présence de lésions complexes. Par exemple, cette nucléase peut hydrolyser les extrémités 3'phosphoglycolate *in vitro*, d'une manière qui est stimulé par la présence de DNA-PK (Povirk et al., 2007). De plus, la phosphorylation d'Artemis par DNA-PK, accorde à cette première une activité endonucléase permettant le clivage des structures en épingles à cheveux ou des « overhangs » en 5' ou en 3' (Ma et al., 2002). La protéine APLF est une endonucléase ainsi qu'une 3'-5' exonucléase impliquée dans l'élimination des overhangs en position 3' et la protéine WRN possède une activité hélicase et exonucléase, cette dernière étant stimulée par Ku (Li et al., 2011a; Perry et al., 2006). Récemment, il a été identifié que la protéine Ku puisse posséder une activité enzymatique elle-même (Roberts et al., 2010). En effet, il semble que Ku possède une activité AP-lyase permettant le clivage en 3' des sites abasiques à proximité des dommages. Cette activité requière la lysine 31 de Ku70 (ou 24 chez la levure) qui est probablement impliquée dans l'attaque nucléophile du site abasique, par un processus conservé chez toutes les AP-lyases (Kosova et al., 2016; Roberts et al., 2010; Strande et al., 2014). Finalement, en présence de lésions complexes (définies par la présence d'au moins deux lésions au sein d'un ou deux tour d'hélice), les polymérases appartenant à la famille X peuvent prévenir la perte d'information génétique en synthétisant localement plusieurs bases (Pour revue : Moon et al., 2007).

2.1.4 La ligation des extrémités

La dernière étape de la voie du C-EJ est la ligation des deux extrémités par l'ADN ligase 4. La ligase 4 est active seule *in vitro*, mais il a été montré que les protéines XRCC4, XLF ou encore APLF stimulent son activité *in vivo* (Ahnesorg et al., 2006; Grawunder et al., 1997; Grundy et al., 2013). De façon intéressante, la ligase 4 est aussi capable de lier des extrémités possédant des « overhangs » non cohésifs ou encore de relier un gap de un nucléotide *in vitro* (Gu et al., 2007). Enfin, les mécanismes de dissolution du complexe de réparation ne sont pas bien caractérisés. Cette étape pourrait nécessiter l'action de certaines ubiquitines ligases assurant la dégradation locale des

protéines du complexe. Par exemple, il a été observé que la protéine RNF8 ubiquitinyle Ku pour faciliter son éjection du site de dommages (Feng and Chen, 2012). De plus, l'autophosphorylation de DNA-PKcs facilite sa dissociation du site de dommages (Uematsu et al., 2007a). Mais une hypothèse plus simple serait aussi d'assumer qu'une fois l'ADN réparé, l'hétéro-dimère Ku ne possède plus d'affinité importante pour l'ADN conduisant ainsi à sa dissociation.

2.1.5 Importance de la voie du C-EJ

L'importance de la voie du C-EJ dans le maintien de la stabilité génétique s'observe aisément chez les souris dans lesquelles les gènes impliqués dans cette voie ont été mutés ou dans les lignées cellulaires équivalentes. Ainsi, les cellules des souris déficientes pour Ku70 ou Ku80 ou DNA-PKcs présentent toutes les trois une augmentation des cassures de l'ADN ainsi que la formation de nombreuses translocations (Ferguson et al., 2000; Karanjawala et al., 1999). De plus les souris déficientes pour Ku70 présentent une incidence accrue de lymphomes alors que les souris déficientes pour Ku80 ou DNA-PKcs et pour la protéine P53 meurent dès trois mois de lymphomes B (Difilippantonio et al., 2000; Gu et al., 1997; Guidos et al., 1996). Cette dernière observation s'applique aussi lorsque l'absence de XRCC4 ou de l'ADN ligase 4 est combinée avec celle de la protéine P53 (Frank et al., 2000; Gao et al., 2000). Le fait que toutes ces souris meurent rapidement de lymphomes B est concordant avec le rôle crucial de la voie du C-EJ au sein de la recombinaison de classe (CSR) lors de la maturation des lymphocytes B. En effet, la voie du C-EJ est essentielle pour la ligation et la réparation des CDBs induites indirectement par la cytidine déaminase AID (Activation-induced cytidine deaminase) (Pour revue : Stavnezer et al., 2008).

2.1.6 Les rôles des PARPs lors du C-EJ

L'implication des protéines PARP1 et PARP2 au sein de la voie du C-EJ n'est pas très claire. Il semble que PARP1 et PARP2 soient recrutées toutes les deux au sites de CDBs de l'ADN et qu'elles interagissent et peuvent les PARyler Ku80 et Ku70 (Carter-O'Connell and Cohen, 2015; Carter-O'Connell et al., 2014; Daniels et al., 2014; Gagne et al., 2008; Gibson et al., 2016; Haince et al., 2008; Isabelle et al., 2012; Jungmichel et al., 2013a; Martello et al., 2016a). Pourtant, le rôle

de ces interactions et de la modification de Ku70 et Ku80 par PARP1 et PARP2 n'a pas été élucidé à ce jour. Un lien entre ces deux PARPs et la réparation des CDBs a néanmoins été fait chez la souris. En effet, l'absence de PARP1 ou de PARP2 combinée avec celle de la kinase ATM est létale au niveau embryonnaire (Huber et al., 2004). Cette létalité précoce est aussi observée lorsque l'absence de PARP1 et de PARP2 est combinée avec celle de l'histone H2AX (Ghosh et al., 2016). La mortalité de ces souris pourrait s'expliquer par l'accumulation de CSBs en absence de PARP1 ou de PARP2, qui, une fois converties en CDBs plus toxiques, ne sont pas réparées efficacement en absence de ATM ou de l'histone H2AX.

Il a aussi été observé que l'absence combinée de la protéine Ku80 et de la protéine PARP1 conduit aussi à une létalité embryonnaire précoce (Henrie et al., 2003) et que la combinaison de l'absence de PARP1 et de DNA-PKcs favorise l'apparition de lymphome T (Rybanska et al., 2013). En revanche, l'absence de PARP2 n'aggrave pas les phénotypes des souris déficientes pour Ku80 ou DNA-PKcs (Ghosh et al., 2016). Ces observations suggèrent que PARP1 possède un rôle spécifique au sein de la réparation des CDBs. En effet, il est peu probable que l'accumulation de CSBs soit responsable de la mort de ces animaux (PARP1$^{-/-}$ / DNAPKcs$^{-/-}$ et PARP1$^{-/-}$ / Ku80$^{-/-}$), puisque l'absence de PARP2 retarde la cinétique de réparation de ces lésions selon la même amplitude que celle de PARP1 (Schreiber et al., 2002). De plus, ces résultats suggèrent aussi que PARP1 n'est pas impliqué dans une voie commune avec Ku80 puisque son absence aggrave la viabilité des souris mutées pour Ku80 (Henrie et al., 2003). Ces observations pourraient donc s'expliquer par un rôle de PARP1 dans une voie alternative de la réparation de CDBs de l'ADN. Cet aspect sera détaillé par la suite lorsque le détail de la voie alternative de jonction des extrémités sera abordé (voir page 102).

En utilisant des substrats permettant de mesurer l'efficacité de la réparation par la voie du C-EJ, il a été observé que l'absence de PARP1 ou que l'ajout d'inhibiteurs de PARP, n'affecte pas l'efficacité de cette voie de la réparation (Mansour et al., 2013; Sharma et al., 2015; Yang et al., 2004). Néanmoins, PARP1 joue un rôle important dans la régulation de la structure de la chromatine en réponse aux dommages de l'ADN. Ainsi, il est possible que PARP1 puisse faciliter l'accès des protéines de la réparation de la voie du C-EJ dans certains contextes chromatiniens, comme l'hétérochromatine. Une étude à récemment décrit que PARP1 facilitait le recrutement du remodeleur de la chromatine CHD2 (Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 2)

(Luijsterburg et al., 2016a). Une fois sur place, CHD2 facilite le dépôt du variant d'histone H3.3, ce qui va stimuler l'efficacité de la voie du C-EJ. Pourtant, les auteurs n'ont pas mesuré l'efficacité du C-EJ en absence de PARP1. En revanche, l'absence de PARP1 diminution la fréquence d'intégration plasmidique, ce qui pourrait suggérer une implication de PARP1 dans la voie du C-EJ, dans certains contextes bien particuliers (Luijsterburg et al., 2016a).

L'efficacité de la voie du C-EJ associée avec l'absence de PARP2 n'a pas été mesurée à ce jour. Néanmoins, sachant que les inhibiteurs de PARP n'affectent pas l'efficacité de la voie du C-EJ et que ces drogues ciblent tout aussi bien l'activité de PARP1 que celle de PARP2, cela suggère très fortement que l'activité de PARP2 n'est pas impliquée dans ce processus. PARP2 semble en revanche participer dans la prise en charge des CDBs induites indirectement par la protéine AID au sein du CSR (Robert et al., 2009). En effet, il a été observé que l'absence de PARP2 est associée avec une augmentation de neuf fois de la fréquence des translocations entre le locus IgH et le locus C-myc, alors qu'en l'absence de PARP1 la fréquence de ces événements est identique à celle des souris sauvage (Robert et al., 2009). Cette observation suggère un rôle spécifique de PARP2 dans la suppression des translocations lors de la maturation des lymphocytes B chez la souris. La formation des réarrangements chromosomiques par translocation faisant majoritairement intervenir la voie du C-EJ chez l'homme et la voie du Alt-EJ chez la souris (Ghezraoui et al., 2014), cela suggère un rôle potentiel de PARP2 dans la régulation de ces voies de la réparation.

A l'inverse, le rôle de PARP3 dans la réparation des CDBs par la voie du C-EJ est maintenant bien établi. La fonction de PARP3 dans la réparation des CDBs de l'ADN a été suggérée lorsque PARP3 a été identifié au sein d'un complexe contenant les protéines DNA-PKcs, Ku70/80, Ligase 4, Ligase3 et PARP1 (Rouleau et al., 2007a). De plus, PARP3 est recruté aux sites de dommages induits par microirradiation laser, indépendamment de son activité enzymatique (Boehler et al., 2011a), mais plutôt de façon dépendante de l'activité de la kinase ATM (Fenton et al., 2013). Finalement, il a été montré que PARP3 facilite la cinétique de réparation des cassures double-brins, d'une manière qui est dépendante de son activité enzymatique (Boehler et al., 2011b; Rulten et al., 2011), et que les cellules humaines déficientes pour PARP3 sont plus sensibles à des agents génotoxiques inducteurs de CDBs de l'ADN (Beck et al., 2014).

De façon plus spécifique, il a été observé que PARP3 coopère avec ATM pour stimuler le recrutement et l'activité de la protéine APLF, stimulant ainsi la ligation des extrémités d'ADN

dépendante de XRCC4 et de l'ADN ligase 4, lors de la réparation des CDBs par la voie du C-EJ (Fenton et al., 2013; Rulten et al., 2011). De plus, la surexpression exogène de XRCC4 suffit à restaurer la cinétique de réparation des CDBs des cellules déficientes pour PARP3, confirmant que PARP3 stimule l'étape de ligation des extrémités (Rulten et al., 2011). L'efficacité du C-EJ est ainsi réduite dans les cellules humaines déficientes pour PARP3 (Beck et al., 2014; Day et al., 2017). Il semblerait aussi que PARP3 modifie Ku70 et Ku80 par ADP-ribosylation et stimule le recrutement de Ku80 aux sites de dommages induits par microirradiation laser (Beck et al., 2014). Finalement, chez la souris, l'efficacité du CSR est augmentée dans les lymphocytes n'exprimant pas PARP3 (Robert et al., 2015). L'analyse des séquences aux points de jonctions montre aussi que l'efficacité de la voie du C-EJ est diminuée. L'ensemble de ces données indiquent donc clairement que l'action de PARP3 stimule la voie du C-EJ, aussi bien chez la souris que dans des cellules humaines. Ceci explique probablement pourquoi PARP3 favorise la formation de translocations dans des lignées cellulaires humaines (Day et al., 2017), puisque la voie du C-EJ est à leur origine chez l'homme (Ghezraoui et al., 2014). Ainsi, malgré un niveau d'activité de PARP3 bien plus faible que celui de PARP1 ou encore de PARP2, PARP3 est essentiel dans le maintien de la stabilité du génome ou encore au cours du développement. Le développement d'inhibiteurs spécifiques de PARP3 sera important par la suite pour faciliter l'identification des fonctions de cette protéine (Lindgren et al., 2013).

2.2 La recombinaison homologue

La voie de réparation des CDBs par recombinaison homologue (ou RH) nécessite comme son nom l'indique, de bénéficier d'une seconde copie homologue de la région contenant la lésion. Le substrat initiateur de la recombinaison consiste en une région d'ADN simple brin de taille suffisante au niveau d'une extrémité d'ADN, qui servira de support à un échange d'information génétique. Cette étape impose donc que l'activité de la RH soit restreinte aux phases S et G2 du cycle cellulaire. Il existe ainsi de nombreux points de contrôle qui restreignent l'activité de la RH aux phase S et G2, et qui inhibent son initiation en phase G1. La RH peut donc être initiée au niveau d'une CDB à deux extrémités comme celles induites par la topoisomérase SPO11 lors de la méiose, ou celles induites directement par les radiations ionisantes, les drogues radiomimétiques ou les endonucléases (voir figure 13). La recombinaison peut aussi débuter au niveau d'une CDB à une

extrémité ou d'un « gap » qui peut être formé lorsque les télomères sont déprotégés mais surtout lorsque qu'une fourche de réplication rencontre une CSB ou une lésion bloquante (voir figure 13). On peut donc lister trois rôles distincts de la RH :

- Un rôle dans la promotion de la diversité génétique au cours de processus physiologiques comme la méiose durant lesquels la RH favorise l'échange d'information génétique entre les allèles parentaux.
- Un rôle dans la réparation des CDBs à deux extrémités qui sont produites par des endonucléases ou des agents génotoxiques
- Un rôle pour assurer la progression de la réplication de l'ADN

Les étapes essentielles de la RH sont l'initiation et l'élongation de la résection permettant la formation d'ADN simple-brin de part et d'autre de la CDB, la formation du filament pré-synaptique, la recherche d'homologie, l'envahissement de la chromatine sœur, la synthèse d'ADN et finalement la dissolution des intermédiaires de recombinaison.

Dans cette partie, je détaillerai essentiellement les premières étapes de la recombinaison homologue, qui permettent la formation de l'ADN simple-brin, et qui sont conservées au sein de la réparation des CDBs par les voies du SSA et du Alt-EJ que je détaillerais par la suite.

2.2.1 La résection des extrémités

Comme décrit précédemment, l'initiation d'un évènement de recombinaison nécessite la présence d'ADN simple-brin. L'ADN simple-brin peut être présent naturellement sous forme de long « gap », par exemple si une fourche de réplication a été ré-amorçée en amont d'une lésion bloquante. Néanmoins, dans la très grande majorité des cas, la formation d'un ADN simple-brin en position 3' à partir des extrémités libres de cassures double brin de l'ADN nécessite l'action coordonnée de nombreuses enzymes qui possèdent des activités endonucléases, exonucléases et hélicases, dans un processus qui est appelé résection.

La plupart de nos connaissances sur les enzymes impliquées dans la résection viennent des études faites chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces pombe* durant la réparation des CDBs induites par SPO11 durant la méiose. Ces études ont permis l'identification

du complexe MRX, composé des trois protéines Mre11p, Rad50p et Xrs2p (Ajimura et al., 1993; Alani et al., 1990; Cao et al., 1990; Nairz and Klein, 1997; Tsubouchi and Ogawa, 1998). L'importance de ce complexe protéique est illustrée par sa très grande conservation chez toutes les espèces (RAD50 et Mre11) (Hopfner et al., 2000; Petrini et al., 1995; Sharples and Leach, 1995). Ce complexe, nommé MRN (Mre11/Rad50/NBS1) chez l'homme, est recruté très rapidement au site de la CDB de l'ADN.

La protéine Mre11 possède plusieurs domaines phosphoéstérase en position N-terminale et deux domaines distincts de liaison à l'ADN en position C-terminale (de Jager et al., 2001a; Trujillo and Sung, 2001). Cette protéine fonctionne sous la forme de dimère et possède une activité endonucléase mais aussi une activité 3'-5'exonucléase (Paull and Gellert, 1998, 1999; Williams et al., 2008). Cette observation est intéressante car Mre11 ne possède pas d'activité 5'-3' exonucléase qui est nécessaire pour la formation d'une extrémité d'ADN simple-brin 3'. Il est maintenant admis que Mre1 va inciser l'ADN en amont de la CDB via son activité endonucléase, puis digérer l'ADN en direction de l'extrémité dans le sens 3'-5' via son activité exonucléase. Ce modèle a tout d'abord été établi dans un contexte d'extrémités bloquées par la topoisomérase SPO11, mais il s'est étendu récemment aux extrémités contenant l'hétéro-dimère Ku (Chanut et al., 2016; Garcia et al., 2011; Mimitou and Symington, 2010; Neale et al., 2005). Cet aspect sera discuté par la suite.

La protéine RAD50 contient deux domaines Walker A et Walker B, impliqués dans la liaison aux extrémités d'ADN et dans l'interaction avec Mre11, ainsi qu'un domaine super-enroulé qui permet une dimérisation avec une seconde molécule de RAD50 située sur l'extrémité opposée. Ainsi, RAD50 va favoriser le maintien des deux extrémités ADN à la CDB (de Jager et al., 2001b; Hopfner et al., 2001) (voir figure 16). RAD50 possède aussi une activité ATPase qui semble stimuler les activités nucléases de Mre11 (Lim et al., 2011; Mockel et al., 2012).

La protéine NBS1 ou Xrs2p est moins bien conservée et n'est présente que chez les eucaryotes. Des mutations hypomorphes du gène *NBS1* sont associées avec le développement du Syndrome de Nijmegen qui se caractérise par une forte radiosensibilité, une immunodéficience et avec une susceptibilité au développement de cancer (Carney et al., 1998). La région C-terminale de NBS1 interagit avec Mre11 mais aussi avec la kinase ATM/tel1p. Ces interactions sont nécessaires pour la présence de Mre11 dans le noyau mais aussi pour le recrutement et l'activation de la kinase ATM (Nakada et al., 2003; Tsukamoto et al., 2005). La région N-terminale contient elle deux domaines

BRCT en tandem ainsi qu'un domaine FHA qui reconnait une forme phosphorylée de la protéine CtIP/Sae2p (Lloyd et al., 2009; Wang et al., 2013a; Williams et al., 2009). La phosphorylation de CtIP est dépendante des cyclines-dependant kinases (CDKs) qui sont pour la plupart, activée de façon dépendante du cycle cellulaire. Ainsi, l'interaction entre CtIP et NBS1 est contrôlée en fonction du cycle cellulaire.

La protéine Sae2p (homologue de CtIP chez l'homme) a été identifiée chez la levure dans un crible ayant pour objectif l'identification des protéines impliquées dans la réparation des CDBs durant la mitose. La délétion de SAE2 produit des phénotypes similaires aux mutations de l'activité ATPase de RAD50 ou de l'activité nucléase de Mre11, suggérant ainsi un rôle de Sae2p dans l'activation de l'activité de Mre11 (McKee and Kleckner, 1997; Prinz et al., 1997; Rattray et al., 2001). Il est maintenant établi que la présence de Sae2p ou de CtIP est un prérequis pour l'activation de l'activité endonucléase de Mre11 et pour l'initiation de la résection (Cannavo and Cejka, 2014; Sartori et al., 2007). Sae2p ou CtIP possède aussi une activité endonucléase qui pourrait être importante pour éliminer les adduits présents aux extrémités comme lors des CDBs induites par des inhibiteurs de topoisomérases (Lengsfeld et al., 2007; Makharashvili et al., 2014). Structurellement, CtIP possède un domaine en superhélice en position N-terminale lui permettant de s'homotétramériser, ce qui est essentiel pour ses fonctions au sein de la RH (Andres et al., 2015; Davies et al., 2015). Enfin, CtIP est phosphorylé en position 847 par les CDK actives durant les phases S et G2 du cycle cellulaire, ce qui est essentiel pour son activation et pour promouvoir l'activité de Mre11 (Huertas and Jackson, 2009), mais aussi par les kinases ATM et ATR (Peterson et al., 2013; Wang et al., 2013b).

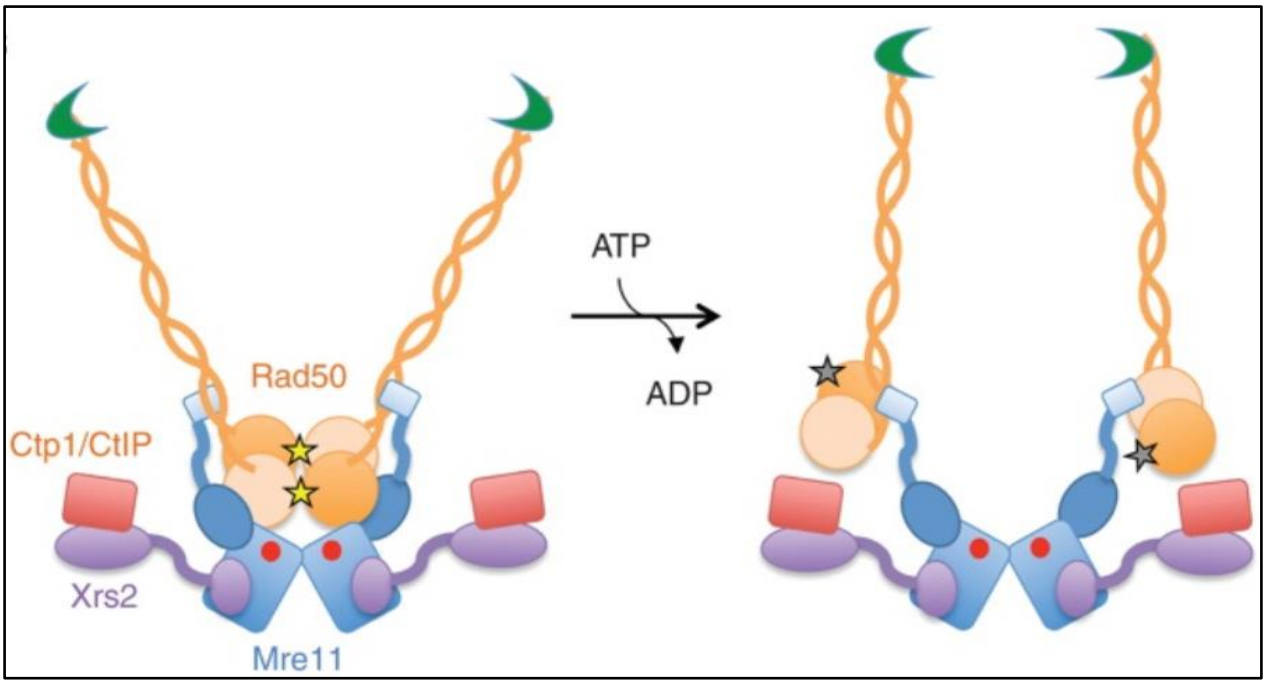


Figure 16 : Organisation structurelle du complexe MRN-CtIP. Schéma représentant les différentes interactions au sein du complexe MRX/MRN. L'activité ATPase de RAD50 hydrolyse l'ATP (étoile jaune à gauche) en ADP (étoile grise à droite) permettant un changement de conformation du dimère Mre11 et ainsi une ouverture de son site actif (points rouges) (Figure adaptée de Symington, 2014).

L'importance du complexe MRN et de la protéine CtIP est illustrée directement par leurs nécessités respectives au sein du développement embryonnaire. Chez la souris, une létalité embryonnaire est en effet observée lors de la déplétion de ces protéines (Chen et al., 2005; Luo et al., 1999; Xiao and Weaver, 1997; Zhu et al., 2001).

Bien que l'initiation de la résection par le complexe MRN facilite la résection sur plusieurs centaines de bases, la résection observée *in vivo* peut s'étendre sur plusieurs kb, suggérant une extension de la résection indépendante du complexe MRN (Zakharyevich et al., 2010). L'étape d'extension de la résection dépend de l'action coordonnée de plusieurs enzymes. D'une part, l'exonucléase 1 (EXO1) peut produire de l'ADN simple brin à partir d'une extrémité d'ADN double-brin, directement via son activité 5'-3' exonucléase (Mimitou and Symington, 2008). D'autre part, les hélicases BLM/Sgs1p et WRN en coopération avec l'endonucléase DNA2 facilitent aussi l'extension de la résection (Gravel et al., 2008; Niu et al., 2010; Zhu et al., 2008).

En effet, La longueur de la résection est fortement réduite en absence d'Exo1p ou de Sgs1p lors de la réparation des CDBs en méiose (Garcia et al., 2011; Zakharyevich et al., 2010). De plus,

le recrutement d'Exo1p et de Dna2p dépend du complexe MRX (Shim et al., 2010), suggérant une résection séquentielle dans le sens 3'-5' puis dans la direction 5'-3'. En revanche, il a été déterminé que l'élimination de Ku restaure le défaut d'initiation de la résection des cellules déficientes pour Sae2p ou Mre11p, de façon dépendante d'Exo1p (Mimitou and Symington, 2010; Shim et al., 2010). De plus, la résection est initiée de façon dépendante d'Exo1p lorsque des CDBs sont induites par l'endonucléase HO (Homothallic switching endonuclease), en absence de Mre11p ou de Sae2p (Llorente and Symington, 2004). C'est-à-dire lorsque l'extrémité est directement accessible à l'action d'Exo1p.

Ces observations, confortées par d'autres études non présentées dans ce manuscrit, sont à la base de l'établissement du modèle bidirectionnel de la résection (Pour revue : Symington, 2014; Symington, 2016) (Voir Figure 17). Lorsque l'extrémité ADN de la CDB est inaccessible aux nucléases impliquées dans la résection (présence d'un adduit covalent comme une topoisomérase ou présence de l'hétérodimère Ku), alors l'action coordonnée des protéines du complexe MRN et de CtIP stimule l'activité endonucléase de MRE11 et produira une CSB en amont de la CDB. L'activité 3'-5' de Mre11 produit ensuite un fragment d'ADN simple-brin 3'. Au site de clivage par MRN, la résection est étendue en direction 5' vers 3' par l'action de EXO1 ou des hélicases BLM et WRN et de l'endonucléase DNA2. C'est le modèle bidirectionnel de la résection (voir figure 17). En revanche, lorsque l'extrémité de la CDB est libre, EXO1 peut promouvoir directement la résection.

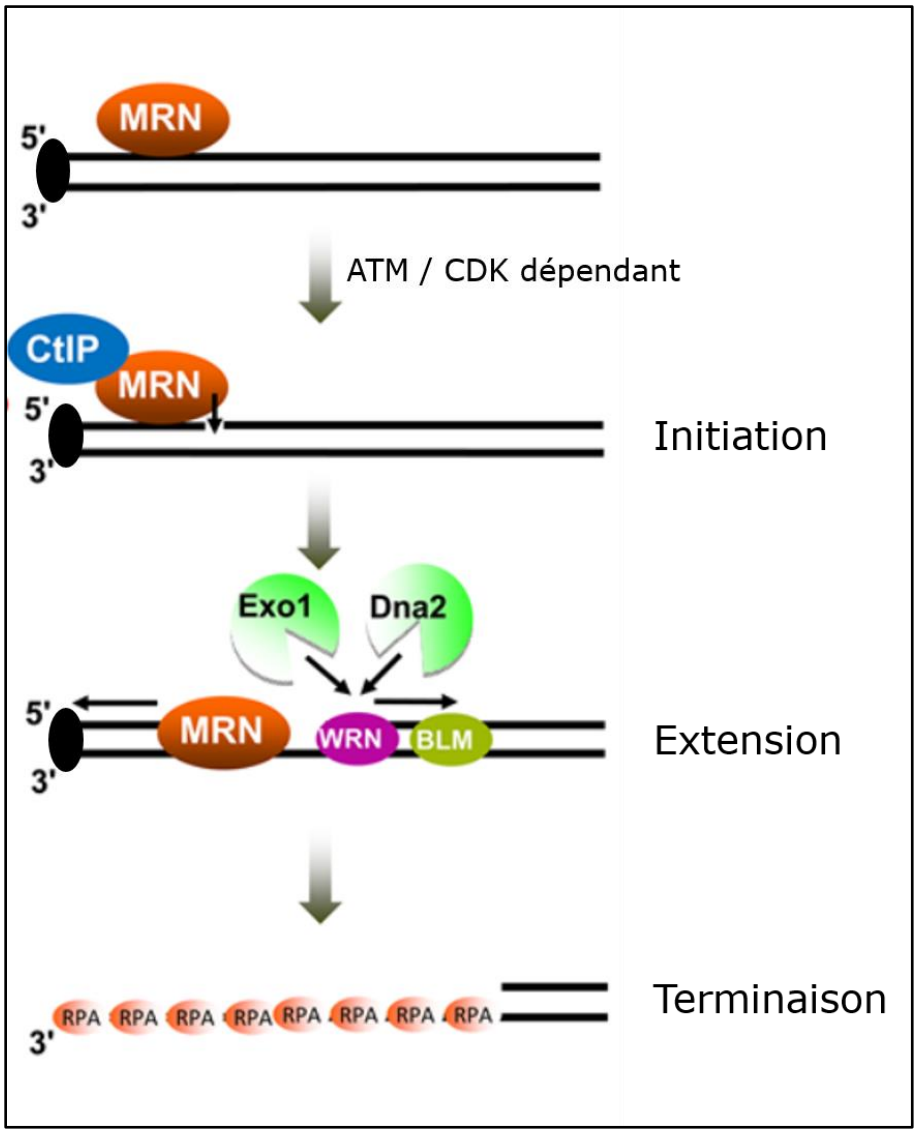


Figure 17 : Les étapes de la résection des extrémités. En réponse à l'induction d'une CDB contenant une extrémité bloquée, on observe un recrutement rapide du complexe MRN. De façon dépendante de l'activité des CDK et d'ATM, la protéine CtIP est recrutée et activée via son interaction avec la protéine NBS1. L'activation successive de Mre11 permet la formation d'une CSB en amont de l'extrémité. La résection est ensuite permise par l'action de Mre11 dans le sens 3'-5' et d'Exo1 ou DNA2/WRN/BLM dans le sens 5'-3'. L'ADN simple-brin formé est ensuite immédiatement stabilisé par l'hétéro-trimère RPA. Finalement, le mécanisme permettant la terminaison de la résection n'est en revanche pas totalement élucidé (Figure adaptée de Paudyal and You, 2016).

Une fois formé, l'ADN simple-brin est immédiatement lié et stabilisé par l'hétéro-trimère RPA. Les trois protéines RPA14, RPA32 et RPA70 reconnaissent l'ADN simple-brin à l'aide de leur domaine OB-fold (Gomes et al., 1996). La liaison de ces protéines sur l'ADN simple-brin joue plusieurs rôles essentiels au sein de la réparation de l'ADN, et ces fonctions ont été décrites de

façon exhaustive dans plusieurs revues (Krasikova et al., 2016; Marechal and Zou, 2015; Zou et al., 2006). L'une de ces fonctions est d'assurer le recrutement et l'activation de la kinase ATR (Zou and Elledge, 2003). Ainsi, l'extension de la résection va conduire à une transition de l'activation d'ATM vers l'activation d'ATR (Shiotani and Zou, 2009).

Finalement, de nombreux processus cellulaires sont impliqués dans le contrôle temporel de la résection et dans la régulation de l'activité des enzymes impliquées dans cette étape. En réponse à un stress de réplication, il a été montré par exemple que la kinase ATR phosphoryle Exo1, ce qui diminue sa stabilité et contrôle négativement la résection (Cotta-Ramusino et al., 2005; El-Shemerly et al., 2008) De plus, il a récemment été identifié que l'hélicase HELB est recrutée au site de dommage et inhibe l'activité de DNA2 et d'Exo1 pour contrôler l'étendue de la résection (Tkac et al., 2016).

2.2.2 L'envahissement de la chromatide sœur et la recombinaison

La protéine RPA est ensuite progressivement remplacée par l'ATPase RAD51, grâce à des médiateurs comme la protéine BRCA2 chez l'homme ou la souris, ou la protéine Rad52p chez la levure. Par l'intermédiaire de ses multiples répétitions BRC, la protéine BRCA2 déstabilise les complexes RPA, et favorise la nucléation de RAD51 spécifiquement au niveau de l'ADN simple-brin (Carreira et al., 2009; Chen et al., 1998; Pellegrini et al., 2002). Les fonctions de BRCA2 sont régulées par l'intermédiaire des multiples partenaires protéiques de cette grande protéine. On peut citer la formation du complexe comprenant les trois protéines BRCA1, PALB2 (Partner and localizer of BRCA2) et BRCA2 qui est nécessaire à la formation du filament de RAD51. La formation de ce complexe est aussi régulée en fonction du cycle cellulaire de façon à inhiber l'étape de recombinaison en phase G1 du cycle cellulaire (Orthwein et al., 2015). Une fois le filament formé, l'action de RAD51 et de ses multiples paralogues va initier la recherche d'homologie par un mécanisme complexe (Pour revue Renkawitz et al., 2014). Après l'envahissement de la chromatide sœur qui conduit à la formation d'une jonction de Holliday, plusieurs mécanismes existent (voir Figure18). La réparation par conversion génique conduit à la formation d'une double jonction de Holliday et le produit de réparation contiendra ou non un crossing-over. Cette voie est essentielle au cours de la méiose pour promouvoir la diversité génétique. En revanche, lors de la voie dite du SDSA (Synthesis dependent strand annealing), la formation de la seconde jonction de

Holliday est inhibée, ce qui conduit à un processus de migration de branche qui conduira à l'effondrement de la première jonction de Holliday. Ainsi, l'extrémité 3' néosynthétisée peut s'apparier avec la seconde, ce qui ne produira pas de crossing-over. Finalement, la voie du BIR (Break-induced replication), prend en charge les CDB à une extrémité qui sont produites lors de la réplication (Pour revue :Anand et al., 2013; Malkova and Ira, 2013).

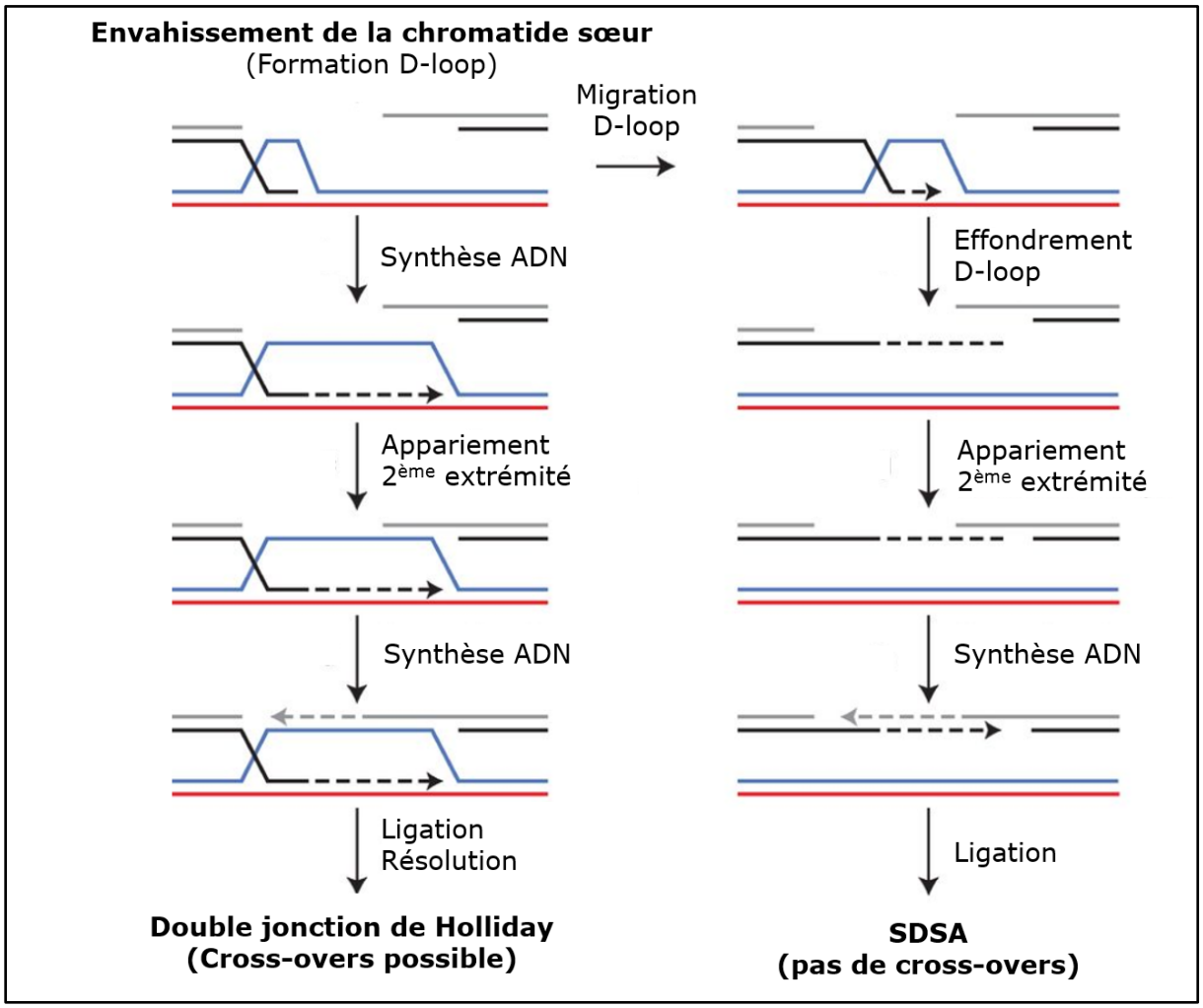


Figure 18 : Les étapes finales de la recombinaison homologue. L'envahissement de la chromatide sœur (brins bleu et rouge) contenant la région d'homologie produit la formation d'une « D-loop ». La synthèse d'ADN permet d'exposer l'ADN simple brin complémentaire à la seconde extrémité 3' formée lors de l'étape de résection (brin bleu et gris). L'appariement de cette extrémité permet de poursuivre la synthèse d'ADN. Après formation de la seconde « D-loop », la résolution des jonctions de Holliday produira ou non des crossing-overs en fonctions des résolvases impliquées dans le processus. En revanche, si la synthèse d'ADN est couplée à la migration de branche, alors la première D-loop s'effondre. L'appariement des deux extrémités originales permet ensuite de compléter la re-synthèse de l'information génétique manquante. Cette sous-voie de la recombinaison homologue ne produit donc pas de crossing-over.

2.2.3 Les fonctions cellulaires de la recombinaison homologue

Même si la voie de jonction des extrémités reste majoritaire pour la réparation de CDBs à deux extrémités franches, induites par des agents génotoxiques ou par des endonucléases en phase S et G2 du cycle cellulaire, la RH peut aussi participer à la réparation de ces CDBs. Cette conclusion est soutenue par plusieurs observations :

- RAD51 s'accumule au niveau de la chromatine déjà répliquée en réponse à une irradiation UV (Tashiro et al., 2000).
- Les acteurs de la RH sont recrutés rapidement en réponse aux dommages de l'ADN induits par micro-irradiation laser du noyau (Dinant et al., 2007; Kim et al., 2005; Li and Yu, 2013; Zhang et al., 2015a).
- L'efficacité de réparation de CDBs simples, induites par des endonucléases comme HO ou Isce1, nécessite les protéines de la recombinaison homologue en phase S et G2 du cycle cellulaire (Adamson et al., 2012; Hicks et al., 2011; Pierce et al., 1999).

La recombinaison est aussi essentielle pour promouvoir la diversité génétique au cours de la méiose. De plus, les crossing-overs ainsi formés sont essentiels pour aligner correctement les chromosomes homologues sur la plaque équatoriale en métaphase. Chez la souris, il est estimé que plus de 50 pour cent des évènements de recombinaison produisent un crossing-over lors de la méiose (Guillon et al., 2005).

Finalement, la RH est essentielle pour assurer la progression de la réplication, pour protéger les fourches de réplication. En effet, les protéines de la RH sont essentielles pour maintenir la stabilité du génome, même en absence de stress exogène. Par exemple, les lymphocytes déficients pour RAD51 accumulent des cassures au cours de la phase S et meurent par apoptose lors de la mitose (Sonoda et al., 1998). En effet, l'absence de RAD51 est associée avec l'accumulation d'ADN simple brin au niveau de la fourche, de façon dépendante de l'activité de Mre11. (Hashimoto et al., 2010). De même, l'absence de BRCA1 ou de BRCA2 est incompatible avec la survie des cellules embryonnaires (Venkitaraman, 2002b). Enfin, la vitesse des fourches de réplication est diminuée lorsque l'efficacité de la RH est impactée (Daboussi et al., 2008). Finalement, la RH est aussi indispensable pour le redémarrage des fourches de réplication dans un certain nombre de situations :

- Soit après son effondrement lorsque la fourche rencontre une CSB pour ré-ammorcer la réplication par un processus similaire à la voie du BIR (Hashimoto et al., 2012).
- Soit après son arrêt prolongé comme par exemple, après un traitement avec des inhibiteurs de la réplication comme l'hydroxyurée ou l'aphidicoline (Petermann et al., 2010).
- Soit pour promouvoir une réversion de fourche en présence d'une lésion bloquante (Zellweger et al., 2015).

Comme nous venons de le voir, la RH est donc essentielle pour promouvoir la stabilité du génome et cela à plusieurs niveaux. Les défauts de RH sont caractérisés par l'accumulation de nombreuses anomalies mitotiques comme des ponts anaphasiques ou des centrosomes surnuméraires (Griffin et al., 2000; Lahkim Bennani-Belhaj et al., 2010). Néanmoins, même si la RH est assez conservative, elle peut être à l'origine d'aberrations chromosomiques comme des duplications, des délétions des pertes d'hétérozygoties ou encore des translocations intrachromosomiques.

2.2.4 Les rôles des PARPs lors de la recombinaison homologue

Les protéines PARP1, PARP2 et PARP3 semblent posséder toutes les trois des fonctions au cours de la RH. Tout d'abord, il est important de noter que l'inhibition de PARP1 et de PARP2 induit la mort des cellules déficientes pour la RH (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Cet aspect sera discuté dans la suite de l'introduction (voir page 119).

Plusieurs études semblent indiquer que la protéine PARP1 ou que l'inhibition de l'activité de PARP1 et de PARP2 n'est pas nécessaire lors de la réparation par la RH, d'une CDB à deux extrémités, induites par des endonucléases (Schultz et al., 2003; Vriend et al., 2016; Yang et al., 2004). Le rôle de la protéine PARP2 n'a pas été déterminé dans ce contexte.

En revanche, l'absence de PARP1 ou de PARP2 chez la souris est associée avec un augmentation de la fréquence des échanges de chromatide sœurs, et l'inhibition ou l'absence de PARP1 est associée avec une augmentation du nombre de foyers RAD51 (Claybon et al., 2010; de Murcia et al., 1997b; Menissier de Murcia et al., 2003; Schultz et al., 2003; Simbulan-Rosenthal et al., 1999). Ces études suggèrent que PARP1 et peut être aussi PARP2 pourrait limiter l'activation

de la RH au cours de la réplication et jouer ainsi un rôle anti-recombinogène. En concordance avec ces résultats, il a été observé que PARP1 et BRCA2 inhibent le recrutement de Mre11 aux fourches de réplications, en présence d'un stress de réplication court (6 heures hydroxyurée) dans des cellules de hamster (Ying et al., 2012). Ceci aurait pour fonction de protéger les fourches de réplication arrêtées, d'une dégradation par Mre11. Dans ce contexte, il semblerait que le recrutement de XRCC1 par PARP1 et DNA-PKcs soit nécessaire à la stabilisation des fourches de réplication (Ying et al., 2016). Néanmoins, chez l'homme, ce même traitement en absence de BRCA2 conduit à la dégradation des fourches de réplication par Mre11 de façon dépendante de l'activité de PARP1 (Ray Chaudhuri et al., 2016). Ces observations pourraient laisser supposer un rôle différentiel de BRCA2 dans la régulation des fonctions de PARP1 et de Mre11, sur la stabilité des fourches bloquées, entre les cellules de hamster et les cellules humaines.

A l'inverse, lorsqu'un stress de réplication prolongé (24 heures hydroxyurée) est appliqué durant la réplication, l'activité de PARP1 et de PARP2 semble nécessaire pour le recrutement de Mre11 au niveau des fourches de réplication. Ce processus serait nécessaire pour assurer le redémarrage des fourches de réplication par la RH. (Bryant et al., 2009; Haince et al., 2008; Orsburn et al., 2010). Finalement, PARP1 pourrait protéger les fourches de réplication de l'action de la voie canonique de jonction des extrémités en inhibant le recrutement de Ku après un traitement à la camptothécine (Hochegger et al., 2006). Dans ce contexte, il semble que l'activité de PARP1 facilite la réversion de fourche mais inhibe aussi l'activité de l'hélicase RECQ1 (Berti et al., 2013; Ray Chaudhuri et al., 2012). Ce mécanisme pourrait ainsi prohiber temporairement un redémarrage des fourches par la RH en attendant la réparation de la lésion contenant la topoisomérase 1, et ainsi expliquer partiellement aussi le rôle anti-recombinogène de PARP1.

Ainsi, ces observations suggèrent un rôle triple de PARP1 et peut-être aussi de PARP2 au niveau des fourches de réplication. En réponse à un arrêt des fourches de réplication, après un stress réplicatif modéré, PARP1 serait nécessaire pour stabiliser les fourches de réplication et prévenir leur dégradation. A l'inverse, après un stress prolongé de réplication ou la rencontre d'une CSB par la machinerie de réplication, conduisant à un effondrement des fourches de réplication, le rôle de PARP1 et de PARP2 serait de promouvoir la RH pour faciliter le redémarrage de la réplication. Finalement, en présence d'une lésion bloquante, PARP1 faciliterait les réversions de fourches en inhibant l'action recombinogène de RECQ1. L'importance de PARP1 et de PARP2 pour assurer

la progression de la réplication est illustrée par la présence d'un stress réplicatif chronique lors de la déplétion de PARP2 ou de l'inhibition de PARP1 et de PARP2 (Colicchia et al., 2017; Farres et al., 2015). Par exemple, les érythrocytes déficients pour PARP2 présentent de nombreux foyers γH2AX en phase S du cycle cellulaire, une phosphorylation constitutive de la protéine CHK1, ainsi qu'une accumulation de micronoyaux (Farres et al., 2015). De plus, PARP2 a été identifié dans un crible à grande échelle, ayant pour objectif d'identifier des protéines impliquées dans la réponse au stress réplicatif induit par l'hydroxyurée (Kavanaugh et al., 2015).

Finalement, il a été démontré que l'efficacité de la RH est diminuée en absence de PARP3, alors même que la résection des extrémités pourraient être plus importante (Beck et al., 2014; Day et al., 2017). Le mécanisme à l'origine de cette observation n'est cependant pas caractérisé, mais il est possible que la résection extensive des cellules déficientes pour PARP3 favorise la voie du SSA au détriment de la RH (voir le descriptif de la voie du SSA ci-dessous). A l'inverse, la description récente d'un rôle de PARP3 dans la réparation des cassures double-brins dans des régions contenant des structures de type G-quadruplex pourrait expliquer cette dernière observation (Day et al., 2017). En effet, de nombreux G-quadruplex putatifs sont présents au niveau du substrat de réparation par la RH, ce qui pourrait expliquer pourquoi l'efficacité de la RH est diminuée en absence de PARP3 (Day et al., 2017).

2.3 La voie de réparation du SSA

La voie de réparation du SSA (pour « single-strand annealing ») consiste, après une étape de résection longue d'une CDB, en l'appariement de longues régions d'homologie présentes de part et d'autre de la CDB, ce qui va conduire à la délétion inévitable de la séquence présente entre les deux régions d'homologie (voir figure 19). Cette voie de la réparation est ainsi fortement mutagène. Néanmoins, cette voie de la réparation est conservée chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, ainsi que chez les mammifères, suggérant un rôle essentiel à la survie cellulaire (Do et al., 2014; Ivanov et al., 1996; Orel et al., 2003; Pontier and Tijsterman, 2009b). Le SSA, est parfois considéré comme une sous-voie de la RH. Toutefois, cette voie ne nécessite pas l'envahissement de la chromatide sœur et est indépendant de la recombinase RAD51 (Stark et al., 2004a). Ainsi, la voie de SSA ne réalise pas un évènement

de recombinaison réel et ne peut donc être complètement associée à la RH, même si ces deux voies de la réparation ont en commun les étapes initiales de formation d'ADN simple brin en 3' de la CDB par résection.

La réparation par le SSA a été décrite dès 1984 par l'équipe du docteur Nat Sternberg, en utilisant des substrats de réparation par recombinaison chez la souris (Lin et al., 1984). Au cours de cette étude, les différentes étapes de cette voie de la réparation ont été décrites. La réparation par la voie du SSA est initiée, comme pour la voie de la RH, par une étape de résection des extrémités qui implique les mêmes enzymes. Ainsi, la déplétion de CtIP, RAD50, BRCA1, EXO1 ou encore DNA2 diminue l'efficacité de la réparation par le SSA (Bennardo et al., 2008; Cannon et al., 2013; Munoz et al., 2012; Stark et al., 2004a; Sturzenegger et al., 2014). Suite à la formation d'ADN simple-brin 3' de part et d'autre de la CDB, la révélation de régions homologues flanquantes peut permettre un appariement des extrémités. La taille minimale nécessaire de la région d'homologie n'est pas bien caractérisée mais cette étape nécessite l'action spécifique de la protéine RAD52 humaine (Rothenberg et al., 2008; Stark et al., 2004a). Le « flap » ainsi produit sera clivé de part et d'autre de la région homologue par l'action coordonnée des endonucléases ERCC1 et XPF (Motycka et al., 2004). Au cours de cette étape, RAD52 recrute et stimule l'activité nucléase de ERCC1 et de XPF (Motycka et al., 2004). Finalement, les polymérases impliquées dans les étapes finales du SSA ne sont pas encore bien caractérisées.

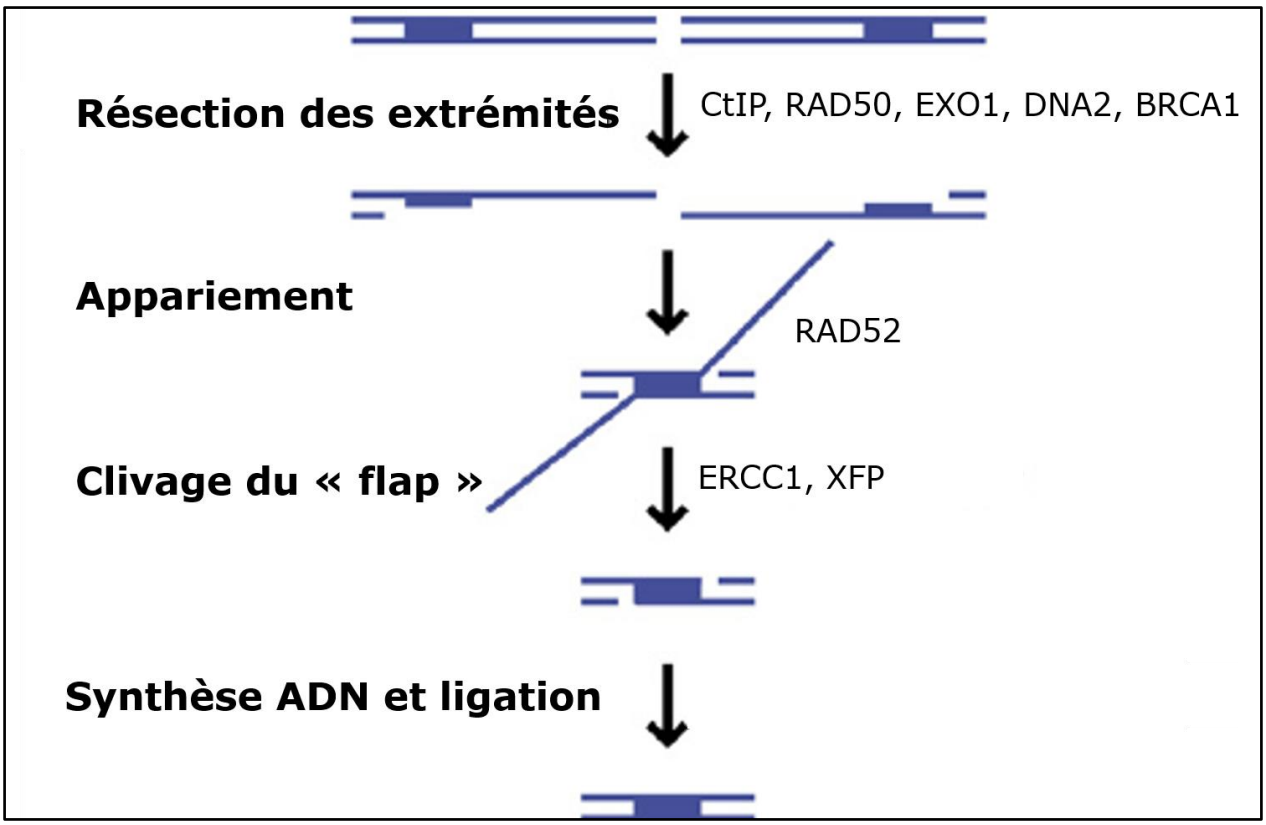


Figure 19 : Les étapes de la réparation des CDBs par la voie du SSA. La réparation d'une CDB par la voie du SSA nécessite une étape extensive de résection de l'ADN et fait intervenir les mêmes enzymes que la voie de la RH. L'appariement des homologies (carrés bleus) est permis par l'intermédiaire de la recombinase RAD52 qui recrute et stimule ensuite les endonucléases XPF et ERCC1, qui sont impliquées dans le clivage du « flap ». La synthèse d'ADN et la ligation successive conduit à un évènement de réparation contenant une délétion (Figure adaptée de Symington et al., 2014).

Comme mentionné précédemment, la voie de réparation des CDBs par le SSA est nécessairement mutagène. Cette voie de la réparation produit des délétions de tailles multiples, mais peut aussi être à l'origine de translocation, si plusieurs CDBs sont induites simultanément. Il est donc étonnant de s'apercevoir que la voie du SSA est bien conservée au cours de l'évolution. Il est aussi important de noter, une large proportion du génome humain est composée de multiples séquences répétées, avec par exemple, plus d'un million d'éléments répétés de type SINEs (« Short Interspersed Nuclear Elements »), représentant plus de 10% du génome humain (Pour revue : Belancio et al., 2010). Ceci pourrait drastiquement stimuler l'efficacité du SSA et avoir des conséquences dramatiques sur la stabilité du génome.

On peut cependant imaginer un contexte durant lequel la voie du SSA serait essentielle. Une fois la réplication de l'ADN entamée, l'activation des CDKs permet l'initiation de la résection lorsqu'une CDB est induite. En effet, la mutation phospho-mimétique de CtIP T847E, qui mime l'activation par les CDKs, est suffisante pour produire de la résection en phase G1 du cycle cellulaire (Huertas and Jackson, 2009). Ainsi, le SSA pourrait être la voie de choix pour réparer une CDB qui a été résectée en phase S du cycle cellulaire, lorsqu'une chromatide sœur n'est pas encore disponible. Cependant, la voie alternative de jonction des extrémités qui sera définie ci-dessous pourrait aussi prendre en charge ce type de lésion.

Finalement, le rôle de PARP1 et de PARP2 au sein de la réparation des CDBs par la voie du SSA n'a quasiment pas été étudié. La seule information disponible semble indiquer que l'ajout d'un inhibiteur de PARP1 et de PARP2 n'affecte pas l'efficacité du SSA (Howard et al., 2015).

2.4 PARP et la voie alternative de jonction des extrémités

Brièvement, la voie alternative de jonction des extrémités (ou Alt-EJ) ressemble beaucoup au SSA. Une résection courte, de part et d'autre d'une CDB, révèle des régions de micro-homologies dont l'appariement suivi de la jonction des extrémités, permet la réparation de l'ADN (voir figure 21). Néanmoins, la voie du Alt-EJ se distingue du SSA au niveau moléculaire par son indépendance de RAD52 (Bennardo et al., 2008; Ma et al., 2003b; Yu and Gabriel, 2003b).

Les premières évidences de la voie alternative de jonction des extrémités (ou Alt-EJ) viennent de l'observation en utilisant des substrats plasmidiques, que les levures ou les cellules de mammifères déficientes pour Ku70, pour Ku80 ou pour l'ADN ligase 4, présentent une capacité résiduelle de jonction des extrémités (Boulton and Jackson, 1996; Liang and Jasin, 1996; Wilson et al., 1997). Dans ce contexte, les substrats réparés semblent présenter fréquemment des micro-homologies de quelques paires de base aux points de jonction (Boulton and Jackson, 1996; Ma et al., 2003a; Yu and Gabriel, 2003a). Ce mécanisme de jonction des extrémités indépendant de Ku et de XRCC4 et de l'ADN ligase 4 a donc été nommé Alt-EJ par opposition au C-EJ. Cette voie a aussi été nommée MMEJ (Microhomology mediated end-joining) ou micro-SSA. Néanmoins, cette appellation peut sembler restrictive car la présence de micro-homologie n'est pas un prérequis absolu à cette voie de la réparation.

La voie du Alt-EJ semble bien conservée au cours de l'évolution et a été décrite chez les bactéries, les plantes, le ver *Caenorhabditis elegans*, la souris ou encore chez l'homme (Aniukwu et al., 2008; Della-Maria et al., 2011; Feldmann et al., 2000; Heacock et al., 2004; Pontier and Tijsterman, 2009a). L'utilisation de substrat de réparation par jonction des extrémités *in vivo*, a permis de mettre en évidence que l'activité de PARP1 était nécessaire pour assurer la jonction des extrémité en absence de Ku (Audebert et al., 2004a; Wang et al., 2006). Il a aussi été suggéré que PARP1 et Ku pouvait entrer en compétition pour la reconnaissance des extrémités au niveau de la CDB (Wang et al., 2006). Néanmoins, l'absence de PARP1 ou l'inhibition de PARP1 et de PARP2 n'affecte pas l'efficacité de jonction des extrémités en présence de Ku (Mansour et al., 2010; Wang et al., 2006).

Pourtant, dans les cellules de mammifères, de nombreuses délétions caractéristiques de la voie du Alt-EJ ont été observées lors de la réparation de CDBs induites par l'expression de I-Sce1, distantes de 3.4kb et cela en présence de Ku (Guirouilh-Barbat et al., 2004; Guirouilh-Barbat et al., 2008; Guirouilh-Barbat et al., 2007). Le rôle de PARP1 et de son activité n'a cependant pas été déterminé dans ce contexte. La voie du Alt-EJ serait aussi importante dans la réparation des CDBs induites au cours de la CSR. En effet, l'absence de PARP1 et de PARP2 n'affecte pas l'efficacité de réparation des CDBs au sein du CSR, mais l'absence de PARP1 est associée avec une diminution de la fréquence et de la taille des micro-homologies présentes au point de jonction (Robert et al., 2009). Ces observations indiquent notamment que la voie du Alt-EJ possède un rôle physiologique qui peut avoir effet, même en présence de l'hétéro-dimère Ku.

De nombreuses études ont impliqué le complexe MRN et la protéine CtIP dans la voie du Alt-EJ (Bennardo et al., 2008; Lee-Theilen et al., 2011; Ma et al., 2003b; Rass et al., 2009; Truong et al., 2013; Xie et al., 2009; Zhuang et al., 2009). En effet, la déplétion de Mre11, RAD50, NBS1 et CtIP affecte l'efficacité de réparation par le Alt-EJ. Il semble donc évident que les mécanismes assurant l'initiation de la résection sont partagés entre les voies de la RH, du SSA et du Alt-EJ (voir figure 20). Sachant que PARP1 facilite le recrutement de Mre11 et de NBS1 au site de micro-irradiation laser, il est possible que le complexe MRN soit recruté de façon dépendante de PARP1 au sein du Alt-EJ (Haince et al., 2008). A l'inverse, la déplétion de la nucléase Exo1 ou de l'hélicase BLM diminue l'efficacité de la RH, mais stimule l'efficacité du Alt-EJ (Truong et al., 2013). Ces données indiquent que l'étape d'extension de la résection n'est pas impliquée dans la réparation

par la voie du Alt-EJ, mais plutôt qu'elle facilite uniquement la RH ainsi que le SSA (voir figure 20).

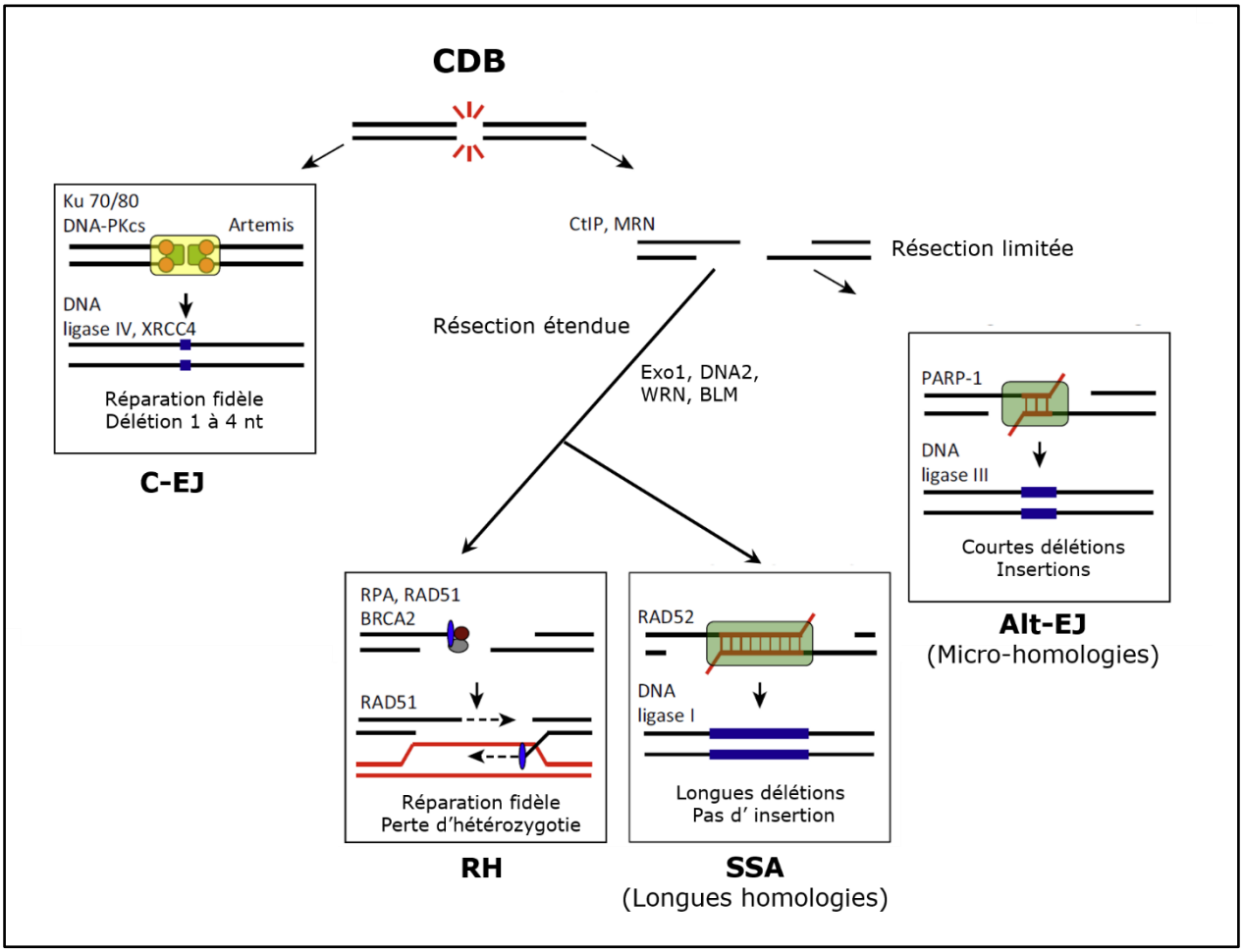


Figure 20 : L'initiation de la résection est commune à la RH, au SSA et au Alt-EJ. Lorsque la résection est bloquée ou n'est pas initiée, une CDB sera réparée par la voie du C-EJ. Cette voie de la réparation est relativement fidèle, même si elle peut produire des petites délétions de quelques nucléotides. A l'inverse, l'initiation de la résection par le complexe MRN en coordination avec l'endonucléase CtIP est commune aux voies de la RH, du SSA et du Alt-EJ. La voie du Alt-EJ requière souvent des petites micro-homologies et est dépendante de PARP1. Le Alt-EJ est à l'origine de petites délétions et aussi de nombreuses insertions. Finalement, l'extension de la résection permet l'initiation de la RH, et du SSA si des régions d'homologies sont présentes (Figure adaptée de Ceccaldi et al., 2016).

L'activité de PARP1 est aussi partiellement responsable du recrutement de la polymérase θ au site de micro-irradiation laser (Mateos-Gomez et al., 2015). Le rôle de cette polymérase (nommée POLQ chez la souris) dans la voie du Alt-EJ a émergé récemment. Cette polymérase / hélicase ne

semble pas impliquée au cours de la réplication de l'ADN mais participe activement au maintien de la stabilité du génome (Goff et al., 2009; Li et al., 2011b). Il semble que l'activité de la polymérase θ soit responsable de la grande majorité des micro-homologies présentes aux points de jonction des extrémités (Wyatt et al., 2016). De plus, cette polymérase est responsable de la présence de courtes insertions, que l'on retrouve fréquemment associée avec la voie du Alt-EJ (Chan et al., 2010; Wyatt et al., 2016; Yu and McVey, 2010). La présence de la polymérase θ au point de jonction permet l'appariement de courtes micro-homologies terminales, mais aussi de micro-homologies internes, formant ainsi un « flap » au point de jonction (Kent et al., 2015 et figure 21). Dans les conditions où un « flap » est associé aux extrémités, l'action des endonucléases ERCC1 et XPF pourrait être nécessaire pour son élimination (Bennardo et al., 2008). Dans cette même étape, il a été décrit que l'activité endonucléase de FEN1 *in vitro* ou celle de son homologue Rad27p pourrait aussi être requise (Göttlich et al., 1998; Liang et al., 2005; Tadi et al., 2016a; Wu et al., 1999).

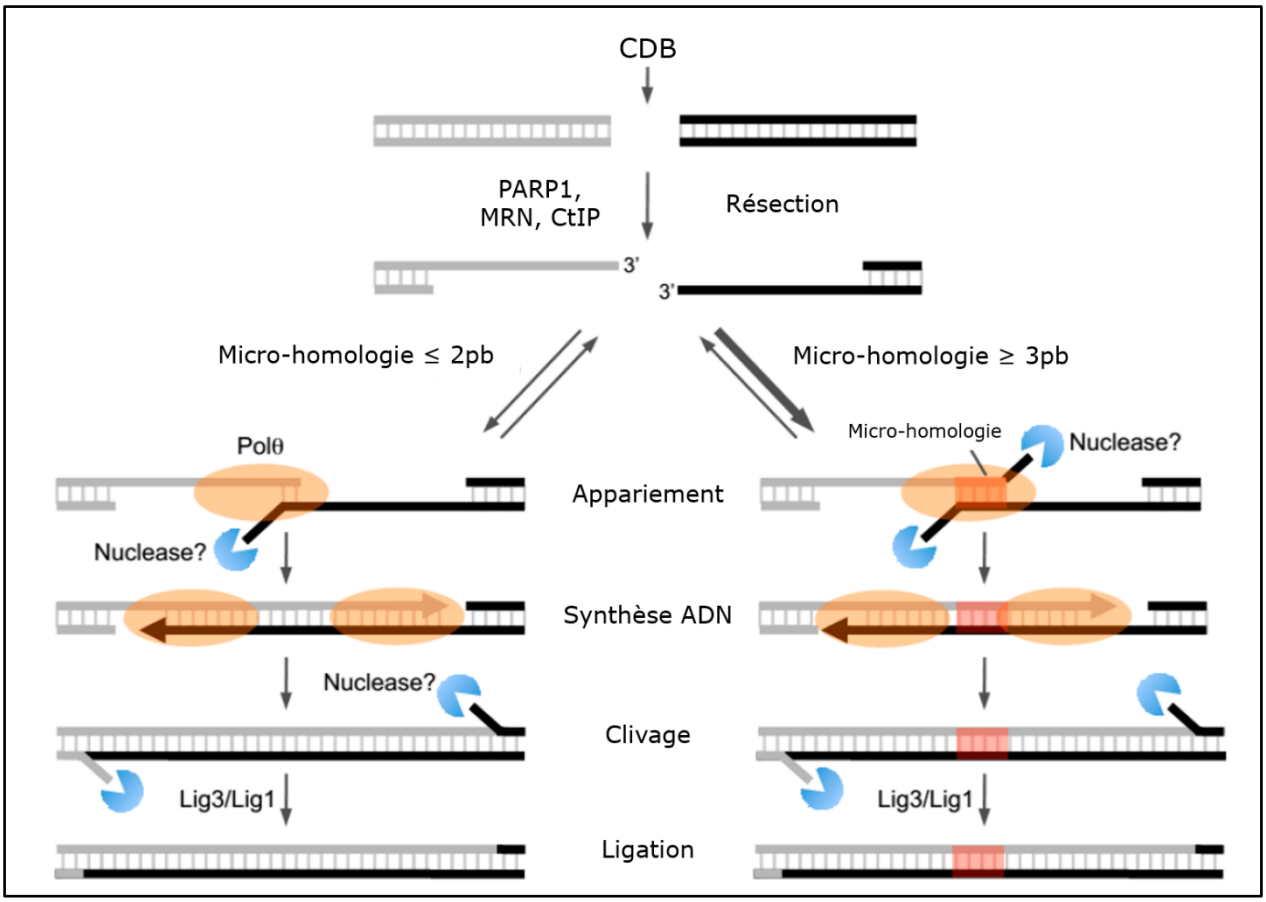


Figure 21 : Les étapes de la voie alternative de jonction des extrémités dépendantes de la polymérase θ. L'initiation du Alt-EJ est assurée par PARP1 en coordination avec le complexe MRN et l'endonucléase CtIP qui favorisent la résection de l'ADN de part et d'autre de la CDB. La polymérase θ qui est recrutée aux sites de dommages par PARP1 joue ensuite un rôle clé pour apparier les extrémités en favorisant l'utilisation de micro-homologies. La polymérase θ assure aussi la synthèse de l'information génétique manquante. Les « flaps » endonucléases ou nucléases responsables de la dégradation du « flap » produit par la polymérase θ ne sont pas bien caractérisées, mais il pourrait s'agir de ERCC1 et XPF qui ont été impliquées dans la voie du Alt-EJ. Finalement, il semble que l'ADN ligase 1 et 3 soient toutes deux capables indépendamment de rejoindre les extrémités (Figure adapée de Black et al., 2016).

En revanche, le mécanisme permettant la jonction des extrémités indépendamment de la présence de micro-homologies dans la voie du Alt-EJ n'est pas caractérisé. Il est intéressant de pointer que la polymérase θ est fortement surexprimée dans de nombreux types de cancers et que son expression est associée avec une importante instabilité génétique, une résistance aux thérapies et avec un mauvais pronostic (Kawamura et al., 2004; Lemee et al., 2010; Pillaire et al., 2010). Finalement, il semble que l'ADN ligase 3 et l'ADN ligase 1 soient toutes les deux capables d'effectuer l'étape finale de jonction des extrémités (Liang et al., 2008).

La voie du Alt-EJ semble active au sein de toutes les phases du cycle cellulaire (Guirouilh-Barbat et al., 2008; Xiong et al., 2015). Pourtant, nous avons vu que l'activité de CtIP est dépendante de la phosphorylation par les CDK qui sont actives en phase S et G2 du cycle cellulaire. Une étude récente suggère que CtIP est phosphorylée par la kinase Plk3 en phase G1 du cycle cellulaire (Barton et al., 2014). Cette phosphorylation serait importante pour initier la réparation par la voie du Alt-EJ dans cette phase du cycle cellulaire (Biehs et al., 2017).

De même, il n'est pas clair si PARP3 est impliqué ou non dans la voie du Alt-EJ. En effet, PARP3 interagit avec PARP1 et l'ADN ligase 3, et pourrait aussi stimuler l'activité de PARP1 (Loseva et al., 2010b; Rouleau et al., 2007b). De plus, l'efficacité de la voie du Alt-EJ est stimulée dans les cellules déficientes pour PARP3 (Beck et al., 2014; Robert et al., 2015), suggérant un rôle de PARP3 dans le Alt-EJ. Cependant, il est fort probable que la stimulation du Alt-EJ, associée avec la perte de PARP3, soit une simple conséquence du défaut de l'efficicacité de la voie du C-EJ. Il sera intéressant de déterminer l'efficacité de la voie du Alt-EJ en absence de PARP3 dans un fond génétique déficient pour Ku80 ou XRCC4 pour conclure sur ce point.

XRCC1 est-il impliqué au sein de la voie du Alt-EJ ? Par des approches de transfection transitoire dans les cellules d'ADN portant des substrats de réparation ou par des approches biochimiques, un rôle du complexe XRCC1/ADN ligase 3 a été suggéré par plusieurs études (Audebert et al., 2004b; Liang et al., 2008; Wang et al., 2005). Plus récemment, l'utilisation de substrats de réparation intégrés dans le génome a démontré que la protéine XRCC1 n'est pas nécessaire à cette voie de la réparation (Boboila et al., 2012; Simsek et al., 2011a; Soni et al., 2014). Ces dernières observations suggèrent que l'implication de la protéine XRCC1 dans la réparation des CDBs est dépendante du contexte de la cassure au sein de la chromatine.

3. Le choix des voies de la réparation des cassures double-brins

Comme décrit ci-dessus, aucune des quatre voies de la réparation des CDBs n'est parfaitement conservatrice. La voie du C-EJ est majoritairement à l'origine de la formation des translocations chromosomiques que l'on retrouvent dans certaines tumeurs chez l'homme (Bhargava et al., 2017; Ghezraoui et al., 2014). La RH peut être responsable d'amplifications, de duplications ou encore de pertes d'hétérozygoties, en particulier au niveau des séquences répétées comme les répétitions

d'ADN ribosomique (McMurray and Gottschling, 2003; Torres-Rosell et al., 2007). La voie du Alt-EJ produit des délétions et des insertions alors que la voie du SSA est à l'origine de longues délétions entre les séquences répétées. Un contrôle strict de l'initiation et du choix de la voie de la réparation est donc essentiel pour préserver l'intégrité du génome.

3.1 L'impact de la nature des extrémités

La nature chimique des extrémités va influencer les modalités de réparation mise en place. Les extrémités franches comportant un 5'-phosphate et un 3'-hydroxyl peuvent être directement prises en charge par une polymérase ou une ADN ligase, ce qui en fait des substrats idéals pour la voie du C-EJ. Ainsi, dans la plupart des systèmes expérimentaux utilisés pour l'étude des voies de la réparation, les extrémités produites sont considérées comme « propres » ou simples et sont facilement prises en charge par les voies du C-EJ ou de la RH. En revanche, *in vivo*, les radiations ionisantes ou les drogues radiomimétiques produisent des extrémités complexes et variées comme les 5'-hydroxyl, les 3'-phosphates, des sites abasiques ou encore présentent des groupements attachés de façon covalente. Ces extrémités peuvent impacter la capacité de liaison de Ku, l'efficacité de résection ou encore la probabilité de ligation. Au sein de la voie du C-EJ, de nombreuses enzymes sont impliquées dans le nettoyage de ces extrémités, mais leur prise en charge par des nucléases comme Artemis pourrait favoriser le Alt-EJ en diminuant l'affinité de Ku. De même, les extrémités produites en phase S au niveau des fourches de réplication sont probablement de pauvres substrats pour Ku et sont donc préférentiellement prises en charge par le RH. La distance entre les extrémités impacte aussi l'efficacité de leur réparation. Alors que la réparation d'une CDB simple ou de deux cassures espacées de 34pb par le C-EJ est très efficace, l'efficacité de réparation diminue drastiquement si les deux CDBs sont espacées de 3.4kb (Gelot et al., 2016). Dans ce contexte, le complexe des cohésines inhibe la jonction des extrémités, probablement pour prévenir l'émergence de translocations. Finalement, la présence de Ku aux extrémités affecte la prise en charge des extrémités et ainsi l'efficacité des voies de la réparation qui dépendent de la résection. Alors que chez la levure la présence de Ku impacte l'efficacité de la résection, la présence de Ku semble inhiber seulement l'assemblage de RAD51 chez les mammifères (Chanut et al., 2016; Clerici et al., 2008; Mimitou and Symington, 2010). L'absence de Ku augmente l'efficacité de la RH, du SSA et du Alt-EJ suggérant que les cellules font une première tentative de réparation par

le C-EJ (Bennardo et al., 2008; Frank-Vaillant and Marcand, 2002; Pierce et al., 2001; Stark et al., 2004a). L'éjection de Ku est aussi dépendante de l'activité de Mre11 et de CtIP qui est elle-même dépendante des CDK, ce qui limite l'initiation de la RH en phase S et G2 du cycle cellulaire (Chanut et al., 2016). Finalement, l'activité d'autres nucléases comme Exo1 est aussi stimulée par phosphorylation facilitant la résection en phase S et G2 (Tomimatsu et al., 2014).

3.2 L'impact de la position de la cassure

En utilisant une lignée cellulaire dans laquelle une enzyme de restriction peut induire des CDBs à des positions précises du génome, l'équipe de Gaelle Legube a mis en évidence que certaines cassures sont réparées préférentiellement par la RH alors que d'autres sont majoritairement prises en charges par la voie du C-EJ (Aymard et al., 2014; Iacovoni et al., 2010; Massip et al., 2010). Ces études ont mis en évidences que les CDBs préférentiellement réparées par la RH sont situées dans les régions transcriptionnellement actives de la chromatine. La chromatine dans ces régions contient la forme tri-méthylée de l'histone H3 (H3K36me3), une modification post-traductionnelle de l'histone H3 qui est catalysée par la méthyltransférase SETD2 (Histone-lysine N-methyltransferase SETD2). De façon intéressante, l'inhibition de la transcription ou la déplétion de SETD2 impacte l'efficacité de la RH dans ces régions et inhibe le recrutement de l'ATPase RAD51 (Aymard et al., 2014; Carvalho et al., 2014; Pfister et al., 2014). A l'inverse, il semble que la forme diméthylée de l'histone H3 (H3K36me2) favorise la réparation par la voie du C-EJ en stimulant le recrutement de Ku70 (Fnu et al., 2011). Ceci indique que certaines modifications post-traductionnelles des histones et donc probablement la structure de la chromatine, participent à régulation du choix de voies de la réparation des CDBs.

Les CDBs dans l'hétérochromatine semblent être majoritairement réparées par la RH d'une manière qui est dépendante de l'activité de la kinase ATM. En effet, ATM phosphoryle la protéine KAP1 (KRAB-associated protein 1), ce qui l'éjecte de la chromatine et facilite la décondensation de la chromatine (Beucher et al., 2009; Goodarzi et al., 2008; Noon et al., 2010). De façon intéressante, PARP2 spécifiquement, interagit avec KAP1 et le PARyle, ce qui permet la localisation de KAP1 au niveau de l'hétérochromatine (Quénet et al., 2008). Néanmoins, l'effet sur la réparation des CDBs n'a pas été étudié dans cette étude. La décondensation de la chromatine

conduit à l'éjection de HP1 (Heterochromatin Protein 1), ce qui découvre le marqueur H3K9me3 et permet le recrutement du complexe acétyl-transférase TIP60/p400 (Sun et al., 2009). Or, l'activité de p400 favorise l'efficacité de la RH en recrutant RAD51 au site de dommage de l'ADN (Courilleau et al., 2012; Taty-Taty et al., 2016). Ainsi l'état de compaction de la chromatine impact sur le choix des voies de la réparation des CDBs indépendament de la séquence ADN.

3.3 L'impact de BRCA1 et de 53BP1

En réponse à l'induction de CDBs, l'activation des kinases ATM ou DNA-PKcs conduit à la phosphorylation de la sérine 139 du variant d'histone H2AX (γH2AX) sur plusieurs kb de part et d'autre de la cassure (An et al., 2010; Burma et al., 2001; Stiff et al., 2004). Cette modification d'histone joue de nombreux rôles dans la réponse aux dommages de l'ADN, mais l'un de ses rôles essentiels est le recrutement de la protéine MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) qui reconnaît spécifiquement γH2AX (Stucki et al., 2005). ATM phosphoryle aussi MDC1 en réponse aux dommages de l'ADN, ce qui permet le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase RNF8 via son domaine FHA, et donc de l'enzyme E2 UBC13 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N) (Mailand et al., 2007; Plans et al., 2006; Yan and Jetten, 2008) (voir figure 22). Le recrutement de RNF8 au site de dommage de l'ADN nécessite aussi la déméthylation de MDC1 par la déméthylase JMJD1C (Jumonji domain-containing protein 1C) (Watanabe et al., 2013). L'action de RNF8 et d'UBC13 induit la poly-ubiquitinylation de l'histone H1, ce qui permet le recrutement successif de l'E3 ubiquitine ligase RNF168, via un domaine spécifique de reconnaissance de l'ubiquitine (Huen et al., 2007; Kolas et al., 2007; Pinato et al., 2011). Le recrutement de RNF168 induit ensuite l'ubiquitinylation des lysines 13 et 15 de l'histone H2A (H2AK13-15ub) (Gatti et al., 2012; Mattiroli et al., 2012) (voir figure 22). De plus, RNF168 reconnait le produit de son activité permettant une amplification locale du signal ubiquitine (Panier et al., 2012). L'action combinée de RNF8 et de RNF168 est cruciale pour l'assemblage de plusieurs complexes protéiques à la chromatine endommagée.

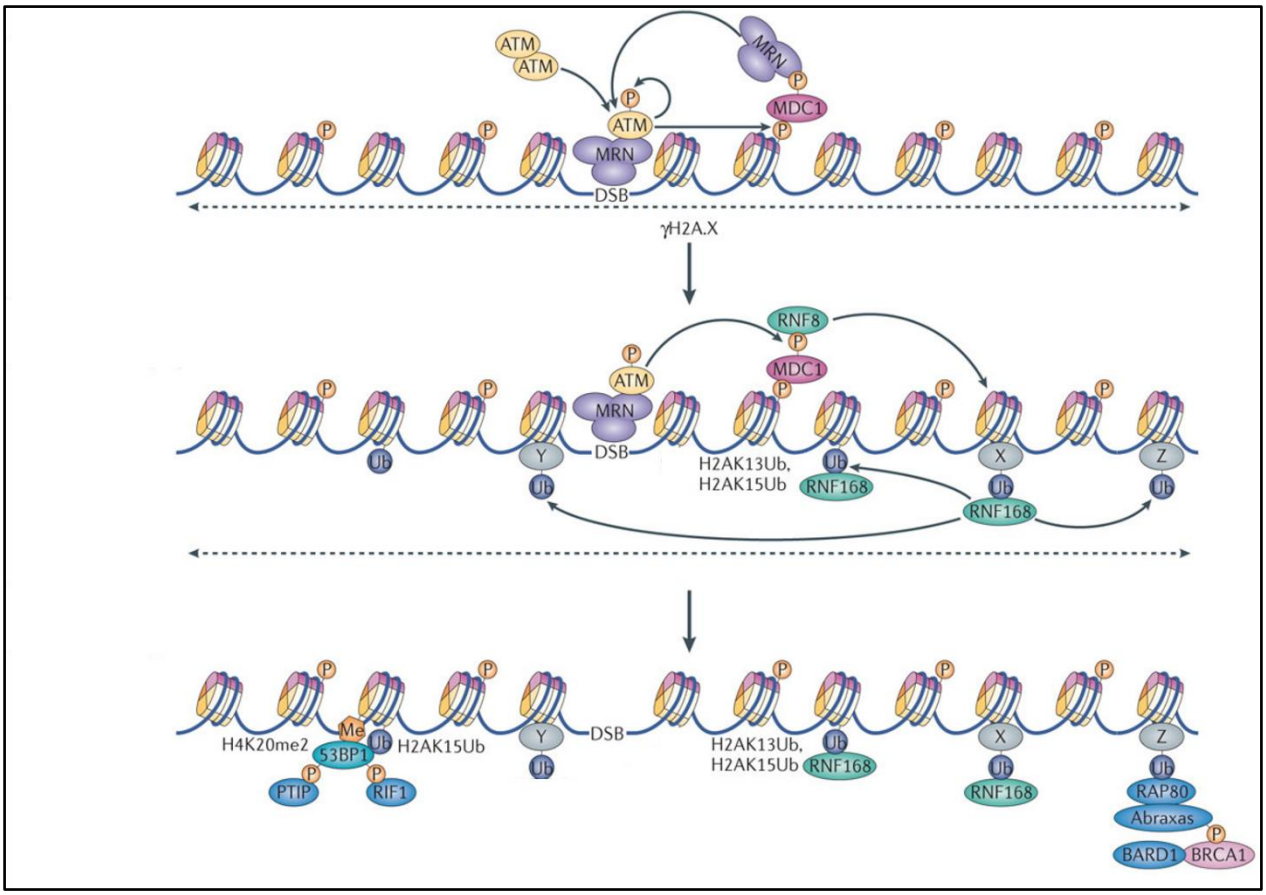


Figure 22 : La transduction du signal dépendante d'ATM au niveau de la chromatine. En réponse à l'induction d'une CDB, le recrutement du complexe MRN permet l'activation et l'autophosphorylation de la kinase ATM. ATM phosphoryle la sérine 139 de l'histone H2AX induisant le recrutement de la protéine MDC1. MDC1 est aussi phosphorylé par ATM, ce qui conduit au recrutement de l'E3 ubiquitine ligase RNF8. Le produit d'ubiquitinylation de RNF8 (noté X) permet le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase RNF168. L'activité de RNF168 conduit à l'ubiquitinylation de l'histone H2A (H2AK15) permettant le recrutement de 53BP1 et de ses effecteurs. RNF168 reconnait aussi son produit d'ubiquitinylation, ce qui favorise l'amplification du signal. L'activité de RNF8 et de RNF168 permet aussi le recrutement du complexe BRCA1-A composé entre autres des protéines BRCA1, RAP80, Abraxas et BARD1 (Figure adaptée de Panier and Durocher, 2013).

D'une part, la protéine RAP80 reconnait les chaînes ubiquitines formées par RNF8 et RNF168, et les chaînes SUMO formées par la protéine RNF4 (Guzzo et al., 2012; Hu et al., 2012; Sobhian et al., 2007). Le recrutement de RAP80 est essentiel pour permettre l'assemblage de la protéine BRCA1 et de ses partenaires, qui forment le complexe BRCA1-A, aux sites de dommages de l'ADN (Sobhian et al., 2007; Wang et al., 2007) (voir figure 22). D'autre part, la protéine 53BP1 qui reconnait spécifiquement H2AK15ub via son motif UDR (Fradet-Turcotte et al., 2013), ainsi que la forme diméthylée de l'histone H4 (H4K20me2) via son domaine Tudor (Botuyan et al.,

2006) est aussi recrutée aux sites de cassures l'ADN (voir figure 22). Bien que recrutées par une voie de signalisation commune dépendante de la kinase ATM et des ubiquitine ligases RNF8 et RNF168, les deux protéines BRCA1 et 53BP1, jouent un rôle antagoniste dans la régulation de la réparation des CDBs. Les fonctions de BRCA1 et de 53BP1 et de leurs partenaires respectifs sont discutés ci-dessous.

3.3.1 La protéine 53BP1et ses partenaires protéiques

53BP1 est une large protéine de 1972 acides aminés qui ne présente pas d'activité enzymatique connue. Néanmoins, 53BP1 interagit avec de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de la réparation des CDBs. Les orthologues de 53BP1 sont Rad9p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et Crb2 chez *Saccharomyces pombe* et présentent une structure globalement bien conservée malgré des séquences divergentes. La région N-terminale de 53BP1 contient de multiples sites de phosphorylation par la kinase ATM, alors que la région C-terminale contient la région minimale permettant le recrutement de 53BP1 aux sites de dommage (domaine d'oligomérisation + domaine Tudor + motif UDR), ainsi que deux domaines BRCT en tandem (Bothmer et al., 2011; Pryde et al., 2005; Zgheib et al., 2009). Les domaines BRCT sont impliqués dans l'interaction de 53BP1 avec le suppresseur de tumeur TP53 (Derbyshire et al., 2002; Joo et al., 2002) alors que la forme phosphorylée par ATM de 53BP1 interagit avec les protéines RIF1 (Telomere-associated protein RIF1) et PTIP (PAX-interacting protein 1) (Callen et al., 2013; Chapman et al., 2013; Di Virgilio et al., 2013; Escribano-Diaz et al., 2013; Zimmermann et al., 2013). Comme décrit précédemment, 53BP1 est recruté aux sites de dommages de l'ADN via la reconnaissance de H2AK15ub par son domaine UDR. Pourtant, la présence de 53BP1 nécessite aussi la reconnaissance de H4K20me2 par son domaine Tudor. La structure de ce mécanisme d'interaction bivalent avec les nucléosomes a été résolu récemment (Wilson et al., 2016). Cette modification étant présente sur plus de 80% des nucléosomes dans des cellules asynchrones et n'étant que peu induite en réponse aux dommages à l'ADN, il est difficile d'envisager comment 53BP1 s'accumule spécifiquement aux sites de dommages de l'ADN (Pesavento et al., 2008; Schotta et al., 2008). Deux études semblent indiquer que les deux protéines JMJD2A (Jumonji domain-containing protein 2A) et L3MBTL1 (Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1), qui possèdent des domaines de liaison à H4K20me2, masquent cette modification en absence de

dommages à l'ADN, et soient dégradées par ubiquitinylation par la voie dépendante de RNF8 en réponse aux dommages à l'ADN (Acs et al., 2011; Mallette et al., 2012). Mais encore une fois, il est peu probable que ces deux protéines soient suffisamment abondantes pour masquer tous les nucléosomes porteurs de cette modification. Une étude récente pourrait avoir résolue cette ambiguïté. Les auteurs ont identifié la protéine TIRR (Tudor interacting repair regulator) comme un partenaire protéique de la forme soluble de 53BP1, masquant le domaine Tudor et donc abolisant la reconnaissance de la forme diméthylée de l'histone H4 (Drané et al., 2017). En réponse aux CDBs, l'activité d'ATM permet le recrutement de RIF1, ce qui abolirait l'interaction entre 53BP1 et TIRR, permettant ainsi le recrutement de 53BP1. Même si ces résultats semblent contradictoires avec des résultats précédemment publiés (Escribano-Diaz et al., 2013), la déplétion de RIF1 pourrait donc abolir fortement le recrutement de 53BP1 aux sites de CDBs de l'ADN (Drané et al., 2017). Finalement, il a été proposé très récemment que la chromatine post-réplicative soit appauvrie en H4K20me2, limitant ainsi *de facto* l'accumulation de 53BP1 (Pellegrino et al., 2017).

Au cours de la réparation de l'ADN, 53BP1 et ses partenaires vont jouer de multiples rôles. Tout d'abord, 53BP1 facilite l'activation de la kinase d'ATM (DiTullio et al., 2002; Fernandez-Capetillo et al., 2002; Wang et al., 2002). En effet, l'absence de 53BP1 limite l'activation de la kinase ATM et donc la phosphorylation des nombreux substrats d'ATM tels que la kinase CHK2 (Checkpoint kinase 2) qui est impliquée dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN. L'absence de 53BP1 permet ainsi aux cellules d'entrer en mitose en présence de dommages de l'ADN, causant alors une importante instabilité génétique. Cette action de 53BP1 pourrait être dépendante de son partenaire PTIP (Jowsey et al., 2004; Munoz et al., 2007).

L'une des fonctions essentielles de 53BP1 et de ses partenaires est de promouvoir la voie canonique de jonction des extrémités. Pourtant, 53BP1 ne semble pas directement impliqué dans la voie du C-EJ mais antagonise plutôt la résection des extrémités des CDBs en phase G1 du cycle cellulaire 53BP1 en association avec son partenaire RIF1, qui lui-même interagit avec la forme phosphorylée par ATM de 53BP1, (Chapman et al., 2013; Di Virgilio et al., 2013; Escribano-Diaz et al., 2013; Zimmermann et al., 2013). En effet, l'initiation de la résection en phase G1 du cycle cellulaire va inhiber l'action de la voie canonique de jonction des extrémités. Ceci pourrait expliquer la radiosensibilité des cellules déficientes pour 53BP1 spécifiquement en phase G1 du

cycle cellulaire (Iwabuchi et al., 2006; Nakamura et al., 2006). Récemment, la protéine MAD2L2 (Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2B) ou Rev7, précédemment connue pour son rôle dans la synthèse d'ADN translésionnelle (Pour revue : Friedberg et al., 2005; Goodman, 2002), a aussi été impliquée dans l'inhibition de la résection dépendante de 53BP1 et de RIF1 en phase G1 du cycle cellulaire (Boersma et al., 2015b; Xu et al., 2015). MAD2L2 est recruté aux sites de dommages de l'ADN via son interaction avec RIF1, et va aussi inhiber la résection en phase G1 du cycle cellulaire, indépendamment de son rôle dans la synthèse d'ADN translésionelle.

Le mécanisme par lequel ces protéines régulent l'initiation de la résection reste largement inconnu à l'heure actuelle. Une possibilité serait peut-être que ces protéines modulent la structure de la chromatine, affectant ainsi l'accès ou l'activité des nucléases aux extrémités. Une étude chez la souris semble indiquer que l'action de 53BP1 inhibe l'initiation de la résection dépendante de CtIP, et non la phase d'élongation qui dépend d'autres protéines telles qu'Exo1 (Polato et al., 2014). Cette étude suggère que 53BP1 et ses partenaires puissent affecter l'activation de CtIP. Ainsi, l'action combinée de la voie 53BP1-RIF1-MAD2L2 semble inhiber la résection dépendante de CtIP pour favoriser la voie du C-EJ en phase G1 du cycle cellulaire. La déplétion de 53BP1, RIF1 ou encore MAD2L2 diminue aussi drastiquement l'efficacité du CSR et de la recombinaison V(D)J, ainsi que la fréquence de formation des fusions télomériques, lorsque les télomères sont déprotégés, trois processus qui dépendent largement de l'efficacité de la voie du C-EJ (Boersma et al., 2015a; Chapman et al., 2013; Escribano-Diaz et al., 2013; Xu et al., 2015; Zimmermann et al., 2013).

A l'opposé, l'action de PTIP semble dépendante du contexte. Tout d'abord, l'absence du recrutement de RIF1 n'impacte pas celui de PTIP, suggérant qu'ATM phosphoryle des résidus différents permettant le recrutement de ces deux protéines (Callen et al., 2013). De plus, l'absence de PTIP n'affecte l'efficacité du CSR dans des lymphocytes B (Callen et al., 2013). A l'inverse, PTIP facilite la fusion des télomères déprotégés et inhibe aussi la résection des extrémités au niveau des CDBs (Callen et al., 2013). Ce rôle pourrait être dépendant de l'activité de la nucléase Artemis qui interagit avec le domaine BRCT de PTIP (Wang et al., 2014). Finalement, une étude récente suggère que PTIP recrute Mre11 au niveau des fourches de réplication, en l'absence des protéines BRCA1 ou BRCA2, conduisant à la dégradation des fourches de réplication (Ray Chaudhuri et al., 2016). La dégradation des fourches de réplication qui est observée en absence de BRCA1 et de

BRCA2 dépendrait en revanche de l'activité de la protéine PARP1 et non des protéines 53BP1 et RIF1. L'action inhibitrice de résection de la voie dépendante de 53BP1 est essentielle en phase G1 du cycle cellulaire et pour promouvoir le CSR. En phase S et G2 du cycle cellulaire, lorsque la résection peut être initiée, il est donc important de lever cette inhibition pour permettre l'initiation de la RH. Au cours de cette étape, l'action de la protéine BRCA1 est essentielle.

3.3.2 La protéine BRCA1

Le gène suppresseur de tumeur codant pour la protéine BRCA1 a été très largement étudié et de nombreuses revues décrivent les multiples fonctions de cette protéine (Pour revue : Deng and Brodie, 2000; Starita and Parvin, 2003; Venkitaraman, 2002a). Des mutations germinales de *BRCA1* sont associées avec une prédisposition importante à développer des cancers du sein et de l'ovaire et des mutations sporadiques de *BRCA1* sont retrouvées dans de nombreux sous-types tumoraux (Nathanson et al., 2001). Il est maintenant accepté que l'instabilité génétique associée avec la déficience de BRCA1 facilite la transformation tumorale. Néanmoins, la raison pour laquelle la transformation tumorale en absence de BRCA1 est tissue-spécifique reste encore obscure. BRCA1 joue un rôle au sein de la transcription, du remodelage de la chromatine, dans la réparation des pontages inter-brins par de la voie FANC ou encore dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire (Pour revue : Jiang and Greenberg, 2015; Powell and Kachnic, 2003). Cependant, la fonction de BRCA1 au sein de la recombinaison homologue est probablement la plus étudiée.

Les fonctions de BRCA1 lors de la RH sont dépendantes sa présence en complexe avec les protéines PALB2 et BRCA2 en réponse aux dommages de l'ADN. Cette interaction est nécessaire pour la localisation de PALB2 aux sites de dommages de l'ADN ainsi que pour le chargement de RAD51 sur l'ADN simple-brin par la protéine BRCA2 (Sy et al., 2009; Zhang et al., 2009a). Ainsi, BRCA1 est critique pour assurer l'efficacité de la RH (Moynahan et al., 1999). Plus important encore, la diminution de l'efficacité de la RH en absence de BRCA1, sensibilise fortement à l'inhibition de l'activité enzymatique des protéines PARP1 et PARP2 (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Les mécanismes associés avec cette hypersensibilité seront discutés ci-dessous (voir

page 120). Cependant, on peut noter dès maintenant que la restauration de l'efficacité de la RH protège les cellules tumorales déficientes pour BRCA1 aux inhibiteurs de PARP.

BRCA1 est aussi essentiel dans la voie du SSA qui partage les étapes initiales de résection mais qui est indépendante de RAD51, suggérant un rôle de BRCA1 dans l'initiation de la résection (Stark et al., 2004a). En effet, la déplétion de RAD51 ou de BRCA2, qui sont uniquement impliquées dans les étapes tardives de la RH, diminue l'efficacité de la RH et augmente l'efficacité du SSA. Cette hypothèse est aussi renforcée par l'observation que la déplétion de BRCA1 inhibe l'efficacité du Alt-EJ qui partage aussi les étapes initiales de la résection des extrémités (Badie et al., 2015; Zhong et al., 2002). Dans ce contexte, il a été identifié que BRCA1 antagonise les fonctions de 53BP1 en phase S et G2 du cycle cellulaire pour promouvoir la résection des extrémités (Bunting et al., 2010). En l'absence de BRCA1, la résection est inhibée par 53BP1, ce qui favorise la voie du C-EJ et conduit à la formation de chromosomes radiaux de façon dépendante de l'activité de l'ADN ligase 4 (Bunting et al., 2010). La déplétion de 53BP1 restaure l'efficacité de la RH des cellules déficientes pour BRCA1 ainsi que la viabilité des souris porteuses d'une mutation de *Brca1*(Bouwman et al., 2010; Bunting et al., 2010; Cao et al., 2009). Dans ce modèle, la restauration de la RH induit une résistance des cellules déficientes pour BRCA1 aux inhibiteurs de PARP (Bouwman et al., 2010; Bunting et al., 2010; Cao et al., 2009). La déplétion de RIF1 et MAD2L2, restaure aussi partiellement l'efficacité de la RH et du SSA en absence de BRCA1, ainsi que la sensibilité aux inhibiteurs de PARP (Boersma et al., 2015a; Chapman et al., 2013; Di Virgilio et al., 2013; Escribano-Diaz et al., 2013; Feng et al., 2013; Xu et al., 2015; Zimmermann et al., 2013).

Le mécanisme par lequel BRCA1 inhibe l'action de 53BP1 et de ses partenaires reste encore obscur. En phase S et G2 du cycle cellulaire, BRCA1 interagit avec le complexe MRN ainsi qu'avec la forme phosphorylée de CtIP par CDK1 (Chen et al., 2008b; Greenberg et al., 2006; Yu and Chen, 2004). Deux études ont mis en évidence que l'interaction de CtIP avec BRCA1 semblait importante pour faciliter la résection des extrémités, probablement en inhibant le recrutement de RIF1 au site de dommages en phase S et G2 du cycle cellulaire par un mécanisme non élucidé (Escribano-Diaz et al., 2013; Yun and Hiom, 2009). Néanmoins, d'autres études n'ont pas relevé d'effet de cette interaction sur l'efficacité de la résection des extrémités, sur la RH ainsi que sur la sensibilité aux agents génotoxiques (Nakamura et al., 2010; Polato et al., 2014; Reczek et al., 2013).

Seule une sensibilité légèrement accrue aux inhibiteurs de topoisomérases I et II a été observée lorsque le site de phosphorylation de CtIP par CDK1 a été muté. Ces ambivalences pourraient s'expliquer par les différents modèles utilisés dans ces études, ainsi que par l'observation récente que l'interaction entre CtIP et BRCA1 n'inhibe pas l'initiation de la résection mais seulement sa vitesse de progression (Cruz-Garcia et al., 2014). Le rôle de l'activité E3 ubiquitine ligase de BRCA1 en partenariat avec BARD1 a aussi été étudié. *In vivo*, l'hétérodimère BRCA1-BARD1 ubiquitinyle les lysines 127 et 129 de l'histone H2A (Kalb et al., 2014). Cette modification semble favoriser le recrutement du remodeleur de la chromatine SMARCAD1 (SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1) favorisant ainsi l'éjection de 53BP1 par un mécanisme non élucidé (Densham et al., 2016). Finalement, un second mécanisme dépendant de RIF1 a été décrit récemment (Zhang et al., 2016). Les auteurs de cette étude ont observé le recrutement aux sites de dommages de l'ADN d'une E3 ubiquitine ligase nommée UHRF1 (E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1), via une interaction avec la forme phosphorylée du domaine BRCT de BRCA1 (Zhang et al., 2016). Il semble que UHRF1 ubiquitinyle RIF1 en phase S du cycle cellulaire, favorisant ainsi sa dissociation et permettant ainsi l'initiation de la résection.

Ainsi, même s'il est maintenant évident que BRCA1 et 53BP1 ont des rôles antagonistes dans la régulation de l'initiation de la résection des extrémités, de nombreux points d'ombre restent encore à éclaircir. Comment la voie 53BP1/RIF1/MAD2L2 inhibe l'initiation de la résection ainsi que le recrutement de BRCA1 en phase G1 du cycle cellulaire ? Comment BRCA1 éjecte 53BP1 et ses partenaires de la chromatine en phase S et G2 du cycle cellulaire ? Existe-t-il des mécanismes distincts en phase S et en phase G2 du cycle cellulaire ? Comment la déplétion de 53BP1 restaure l'efficacité de la RH en absence de BRCA1, alors même que BRCA1 est aussi impliqué dans le chargement de RAD51 sur l'ADN simple-brin ? La réponse à ces différentes questions permettra d'affiner nos connaissances des processus assurant le maintien de la stabilité du génome ainsi que des mécanismes impliqués dans la sensibilité et la résistance des cellules tumorales aux agents de chimiothérapie. En effet, même si la déficience de la RH dans les cellules tumorales est associée avec une sensibilité accrue aux sels de platine et aux inhibiteurs de PARP (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005; Telli et al., 2016), des mutations secondaires ou la modulation de l'expression de BRCA1, BRCA2, MAD2L2, PTIP, 53BP1 sont associées avec une restauration de la RH et une

résistance aux thérapies (Barber et al., 2013; Edwards et al., 2008; Jaspers et al., 2013; Ray Chaudhuri et al., 2016; Xu et al., 2015).

4. Les inhibiteurs de PARP

Des petites molécules inhibitrices de PARP ont été utilisées dans les laboratoires de recherche depuis les années 1980 (Purnell and Whish, 1980; Terada et al., 1979). Ces premiers inhibiteurs de PARP sont des analogues du nicotinamide, tel que le 3-Aminobenzamide (3-AB) et présentent une affinité pour PARP1 de l'ordre du micromolaire. Rapidement, le groupe de Sydney Shall a mis en évidence que l'inhibition de PARP1 prévenait la jonction des CSBs de l'ADN causées par le diméthyle sulfate, un agent alkylant, et augmentait sa toxicité dans une lignée lymphoblastique murine (DURKACZ et al., 1981). Le rationnel de ces études était de déterminer si des inhibiteurs de PARP pouvaient potentialiser les effets cytotoxiques de la chimiothérapie et de la radiothérapie. La co-cristallisation du domaine catalytique de PARP1 chez le poulet avec ces différents inhibiteurs a mis en évidence qu'ils se liaient spécifiquement au sein de la poche catalytique de PARP1 (Ruf et al., 1998a; Ruf et al., 1996). Cette observation est consistante avec le développement d'inhibiteurs dérivés du nicotinamide. Lorsque PARP2 a été identifié dans les années 1990, il est apparu que son domaine catalytique était presque identique à celui de PARP1 (Ame et al., 1999). Pour cette raison, PARP2 est ciblé tout aussi efficacement que PARP1 par les différents inhibiteurs de PARP. Seules deux légères variations au sein du domaine hélicoïdal et dans la boucle acceptrice du site catalytique de PARP2 suggère qu'une sélectivité pour cette dernière pourrait être obtenue (Oliver et al., 2004).

Depuis, un effort considérable menée par de nombreuses laboratoires pharmaceutiques à conduit aux développement d'inhibiteurs de PARP plus spécifiques incluant le veliparib (Abbvie), le rucaparib (Pfizer/Clovis), l'olaparib (KuDOS/AstraZeneca), le niraparib (Merck/Tesaro) ainsi que l'inhibiteur de seconde génération, le talazoparib (Lead/Biomarin/Medivation/Pfizer). Tous ces inhibiteurs interagissent aussi avec les poches catalytiques contenant le nicotinamide de PARP1 et de PARP2, et ne sont donc pas à ce titre spécifiques de PARP1 ou de PARP2 (Knezevic et al., 2016). En revanche, ils diffèrent dans leur action cytotoxique de par une capacité différentielle à

piéger les protéines PARP à la chromatine (Murai et al., 2012; Murai et al., 2014). Cet aspect qui a été mis en évidence par l'équipe d'Yves Pommier sera développé par la suite.

Une étape majeure a été franchie lorsque les groupes d'Alan Ashworth et de Thomas Helleday ont conjointement mis en évidence que la déficience pour la voie de la RH dans les lignées cellulaires mutées pour BRCA1 ou BRCA2, induit une extrême sensibilité aux inhibiteurs de PARP (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Ces résultats sont d'autant plus importants que des mutations germinales de BRCA1 et de BRCA2 sont associées avec une susceptibilité importante au développement des cancers du sein et de l'ovaire (Petrucelli et al., 2013). Ces études sont les premières suggérant que les inhibiteurs de PARP puissent être utilisés en monothérapie. Depuis, les mutations d'autres gènes tels que *ATM*, *ATR*, *PTEN*, *RAD51* ou encore ceux de la voie FANC, ont aussi été associées avec un défaut de la RH et ainsi avec une sensibilité aux inhibiteurs de PARP (Kais et al., 2016; Mendes-Pereira et al., 2009; Wang et al., 2017; Weston et al., 2010; Yazinski et al., 2017). De très nombreuses études ont été menées par la suite pour déterminer l'efficacité clinique de ces différents inhibiteurs (https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=parp+inhibitor&Search=Search et figure 23). Ces études ont abouti dès 2014 à l'autorisation de l'olaparib en maintenance, chez des patientes atteintes de cancers ovariens, porteuses de mutations germinales de BRCA1 et de BRCA2, et après trois lignes de traitement par chimiothérapie (Kim et al., 2015). Dans ce contexte, le traitement à l'olaparib est associée une durée de réponse de plus de 8 mois ainsi qu'avec des effets secondaires limités comme des anémies, neutropénies et thrombocytopénies (Kaufman et al., 2015). Les résultats positifs d'autres études cliniques pourraient aussi rapidement étendre l'indication de l'olaparib dans les cancers du sein et de la prostate, déficients pour la RH. Finalement, de nombreux autres essais cliniques sont en cours pour évaluer l'intérêt de l'olaparib en monothérapie ou en combinaison avec la chimiothérapie ou la radiothérapie. En 2016, le rucaparib a aussi été accepté dans le traitement des cancers ovariens déficients pour la RH, après deux lignées de chimiothérapie (Syed, 2017). Finalement, le niraparib a été accepté récemment pour traiter les cancers de l'ovaire qui répondent à une chimiothérapie à base de sels de platine, et cela indépendamment du statut BRCA (Scott, 2017). Ainsi, ces dernières années ont vu une progression fulgurante du développement des inhibiteurs de PARP en cancérologie, et les résultats récents indiquent que leurs indications promettent de continuer à progresser rapidement avec des résultats très prometteurs dans les cancers du sein et de la prostate.

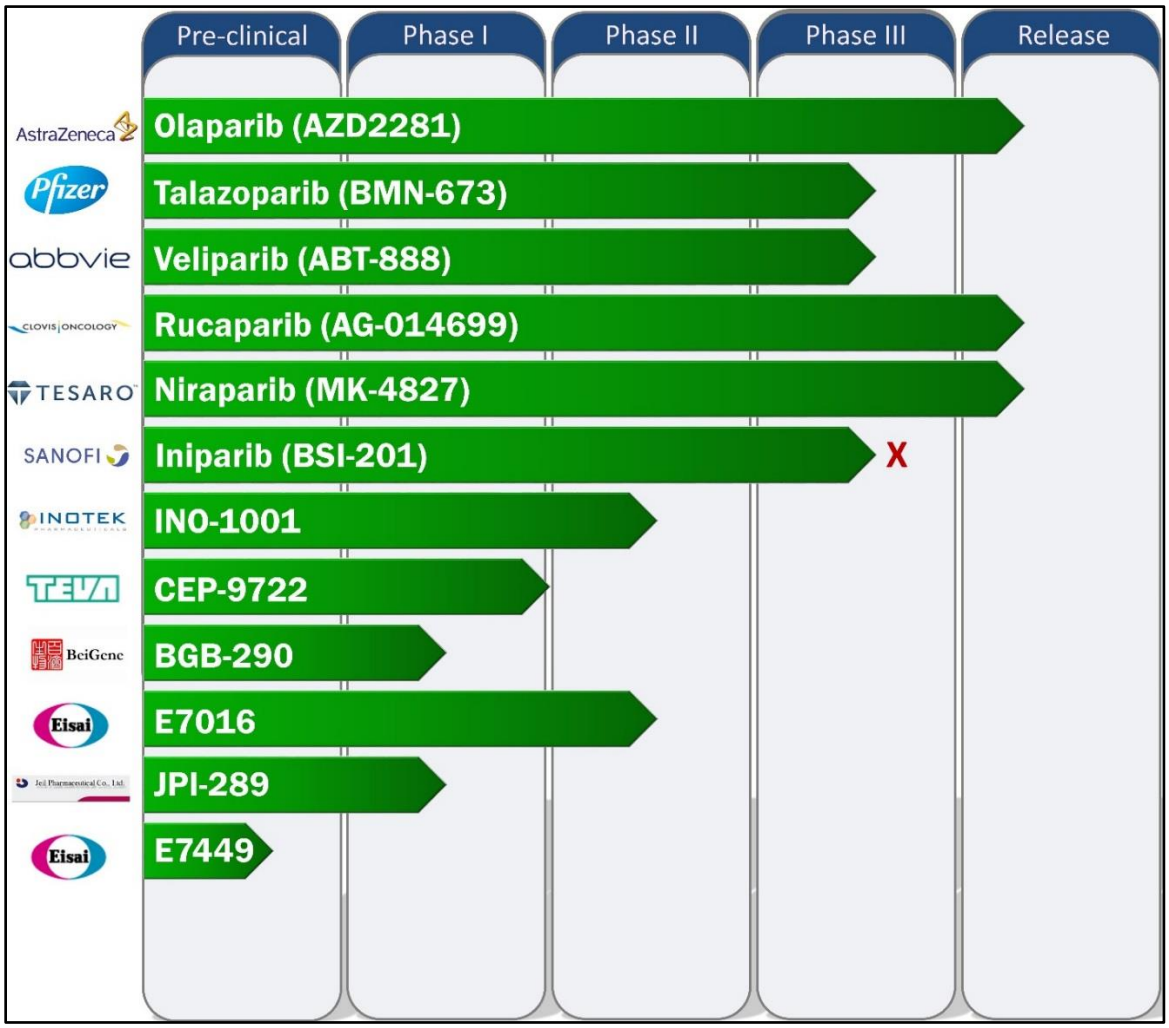


Figure 23 : Niveau de développement des différents inhibiteurs de PARP : un état des lieux en 2017. La croix rouge indique un arrêt prématuré dans le développement du candidat médicament.

4.1 Le mécanisme d'action des inhibiteurs de PARP

Il est maintenant évident que les inhibiteurs de PARP sont toxiques pour les cellules déficientes pour la RH. Cependant, la cause principale de l'hypersensibilité tumorale, observée *in vivo*, n'est toujours pas complétement élucidée, et cela pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les inhibiteurs de PARP, affectent aussi bien l'activité de PARP1 que de PARP2, voir celle des tankyrases. De plus, il a récemment été observé que certaines enzymes comme l'hexose-6-phosphate déshydrogénase ou encore la désoxycytidine kinase pouvaient être ciblées par les inhibiteurs de PARP (Knezevic et al., 2016). Les protéines PARP1 et PARP2 jouent aussi des rôles multiples redondants dans la réparation rendant l'étude de leurs fonctions spécifiques difficiles. Par exemple, les souris

PARP2^{KO} sont anémiques et neutropéniques, ce qui est causé par la présence d'un stress réplicatif élevé au sein des erythroblastes murins (Farres et al., 2015). Or, ces observations sont retrouvées chez les patients traités avec des inhibiteurs de PARP, suggérant que l'inhibition de PARP2 spécifiquement pourrait être responsable des effets secondaires majeurs des inhibiteurs de PARP. Finalement, plusieurs mécanismes d'action ont été proposés.

La première hypothèse formulée pour expliquer l'hypersensibilité observée dans les lignées cellulaires déficientes pour BRCA1 ou BRCA2 aux inhibiteurs de PARP, suggère que l'inhibition des PARP produit l'accumulation de CSBs persistantes. Lorsqu'une fourche de réplication rencontre ces lésions, un effondrement de la fourche et la formation de CDBs à une extrémité peut intervenir. Ces lésions étant des substrats pour la RH, les cellules déficientes pour la RH ne seront pas en mesurer de réparer ces CDBs (Arnaudeau et al., 2001; Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Cependant, même si la cinétique de réparation des CSBs est affectée par l'absence de PARP1 et de PARP2, la persistance de ces CSBs n'a pas été démontrée pour l'instant (Fisher et al., 2007b; Gottipati et al., 2010; Schreiber et al., 2002; Strom et al., 2011), suggérant que les CSBs sont néanmoins réparées. Toutefois, une accumulation majeure de foyers γ-H2AX est observée en phase S du cycle cellulaire après inhibition des PARP (Albert et al., 2007; Bryant et al., 2005; Dale Rein et al., 2015), ce qui suggère la présence d'un stress réplicatif important et aussi que l'activité PARP est requise lors de la réplication.

Par la suite, un second mécanisme a été proposé, suggérant que la prise en charge des CDBs formées au cours de la réplication, par la voie de jonction des extrémités, serait responsable de l'instabilité génétique observée à la suite de l'inhibition des PARP (Patel et al., 2011). Les auteurs de cette étude ont en effet observé que l'inhibition de DNA-PKcs, la déplétion de Ku80 ou de la nucléase Artemis restaure la viabilité des cellules déficientes pour la RH. Cependant, sachant que ces protéines sont des inhibiteurs de la résection (Wang et al., 2014; Zhou and Paull, 2013), il semblerait plutôt que la restauration de la résection et donc de la RH explique le mécanisme de résistance observé dans cette étude.

Finalement, l'équipe d'Yves Pommier a mis en évidence en 2012 un troisième mécanisme de cytotoxicité des inhibiteurs de PARP qui détiennent la capacité de piéger les protéines PARP1 et PARP2 aux sites de dommages de l'ADN (Murai et al., 2012; Murai et al., 2014). Ce mécanisme ressemble à ce qui a été précédemment décrit pour les inhibiteurs des topoisomérases I et II

(Pommier, 2013). La capacité des inhibiteurs de PARP à piéger PARP1 et PARP2 à la chromatine est directement corrélée avec leur action cytotoxique comme suit : talazoparib >> niraparib > olaparib = rucaparib >> veliparib. Supportant cette idée, la déplétion de PARP1 restaure la viabilité des cellules normales en présence d'inhibiteurs de PARP (Murai et al., 2012; Pettitt et al., 2013). Ce mécanisme est probablement essentiel dans l'action cytotoxique des inhibiteurs de PARP en combinaison avec la radiothérapie et la chimiothérapie, mais n'explique cependant pas l'hypersensibilité des cellules déficientes pour la RH.

Ainsi, plusieurs mécanismes d'action des inhibiteurs de PARP ont été proposés et il est probable que la combinaison de ces effets soit responsable de l'action de ces drogues. De plus, les protéines PARP1 et PARP2 participent à de nombreux processus cellulaires qui ne seront pas tous détaillés dans cette introduction (apoptose, métabolisme, transcription, immunité, développement embryonnaire). Il est probable que ces rôles, distincts de la réparation de l'ADN, participent au moins en partie à l'action et à l'effet des inhibiteurs de PARP sur l'organisme.

4.2 Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de PARP

Comme pour la majorité des thérapies ciblées qui ont été développées jusqu'à maintenant, l'émergence de résistance aux inhibiteurs de PARP a été décrite. Alors que l'utilisation de ces drogues promet de croître, les problèmes associés aux résistances vont devenir de plus en plus alarmants. La compréhension de ces mécanismes de résistance est donc essentielle pour optimiser l'efficacité des inhibiteurs de PARP. Les principaux mécanismes identifiés à ce jour sont listés ci-dessous :

- *In vivo*, il a été identifié que l'olaparib et le rucaparib sont des substrats des pompes d'efflux comme la protéine MDR1 (Multidrug resistance protein 1), et que la surexpression de ces protéines est associée avec une résistance (Durmus et al., 2015; Lawlor et al., 2014). En revanche, le veliparib n'est pas concerné par ce mécanisme (Lawlor et al., 2014). Le traitement avec l'inhibiteur de ces pompes, le tariquidar réverse ces résistances (Kelly et al., 2012; Rottenberg et al., 2008), de même que l'utilisation d'un dérivé de l'olaparib, non ciblé par les pompes d'efflux (Henneman et al., 2015). L'utilisation de ce dérivé de l'olaparib diminue aussi le risque d'émergence de complications hématologiques chez la

souris (Oplustil O'Connor et al., 2016). Alors que l'olaparib cible aussi PARP3 avec un IC50 relativement faible, ce dérivé de l'olaparib ne présente pas une affinité importante pour cette enzyme, suggérant que l'inhibition de PARP3 par l'olaparib est associée avec un risque accru de développement d'effets secondaires (Oplustil O'Connor et al., 2016).

- La restauration de l'efficacité de la RH a été décrite dans de nombreuses études et par de multiples mécanismes. Tout d'abord, des mutations secondaires au sein des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* permettent de restaurer le cadre de lecture des ORFs ou les fonctions de ces deux gènes (Drost et al., 2011; Edwards et al., 2008; Johnson et al., 2013; Sakai et al., 2008; Wang et al., 2016a; Wang et al., 2016b). L'expression de BRCA1 peut aussi être restaurée de façon épigénétique (Ter Brugge et al., 2016). De plus, la surexpression de la protéine HOXA9 (Homeobox protein Hox-A9) semble aussi faciliter l'accumulation de RAD51 aux CDBs et permettre une résistance aux PARPi dans certains modèles de leucémies (Esposito et al., 2015). Finalement, comme décrit précédemment, la perte additionnelle de l'expression de gènes impliqués dans l'inhibition de la résection comme *53BP1* ou *MAD2L2*, restaure aussi l'efficacité de la RH (Jaspers et al., 2013; Xu et al., 2015).
- La surexpression de proto-oncogène c-Met est associée avec une résistance aux inhibiteurs de PARP (Du et al., 2016). Les auteurs de cette étude ont démontré que c-Met phosphoryle PARP1 en position 907, ce qui augmente son activité et diminue sa capacité de liaison à l'ADN. La présence de cette phosphorylation est associée avec une résistance mais le mécanisme n'a pas été élucidé.
- Finalement, un mécanisme de stabilisation des fourches de réplication a été proposé récemment (Ray Chaudhuri et al., 2016). Il a été suggéré que la perte de PARP1 ou PTIP inhibe l'action de la nucléase Mre11 au niveau des fourches de réplication en absence de BRCA1 ou de BRCA2, stabilisant les fourches de réplication et conduisant à une résistance à la chimiothérapie et aux inhibiteurs de PARP (Ray Chaudhuri et al., 2016).

Ainsi, il sera essentiel de développer dans le futur des stratégies permettant de contrecarrer ces résistances. L'hyperthermie a été suggérée car les hautes températures semblent inhiber la RH en déstabilisant les protéines RAD51 et BRCA2, sensibilisant ainsi les tumeurs résistantes aux inhibiteurs de PARP, mais aussi les tumeurs compétentes pour la RH (Bergs et al., 2013; Krawczyk et al., 2011). Dans la même optique, des inhibiteurs des histones déacétylases, de HSP90 (Heat shock protein HSP 90), ou de CDK1 déstabilisent ou inhibent plusieurs protéines de la RH

sensibilisant les cellules tumorales aux inhibiteurs de PARP (Ha et al., 2014; Jasek et al., 2014; Johnson et al., 2013; Kachhap et al., 2010; Stecklein et al., 2012) .

CHAPITRE 3 :
Les autres fonctions de la protéine PARP2

Au cours du chapitre précédent, les diverses fonctions de PARP1, de PARP2 et de PARP3 au cours de la réparation des cassures de l'ADN ont été détaillées. Même si plusieurs études suggèrent des rôles spécifiques de PARP2 dans la réparation des cassures de l'ADN, ces fonctions semblent pour l'instant assez inextricables de celles de PARP1. D'autre part, la protéine PARP2 a été impliquée dans de nombreux autres processus cellulaires en lien avec la cancérogénèse tels que la régulation de la transcription, du cycle cellulaire, du métabolisme, de la ségrégation chromosomique et finalement de la maintenance des télomères. Sachant que l'étude des fonctions de PARP2 a constitué l'essentiel de mes travaux de doctorat, je détaillerai les fonctions spécifiques de PARP2 dans cette section. Les fonctions de PARP1 dans ces processus ne seront pas détaillées ici et le lecteur est invité à se référer à plusieurs revues détaillées (Ciccarone et al., 2017; Kraus and Hottiger, 2013; Li et al., 2015; Luna et al., 2013; Schiewer and Knudsen, 2014; Weaver and Yang, 2013; Xu et al., 2014a). De même, on peut noter que PARP3 a aussi été impliqué dans des processus indépendant de la réparation de l'ADN qui ne seront pas détaillés : dans la stabilisation du fuseau mitotique (Boehler et al., 2011a), au cours du développement neuronal (Rouleau et al., 2011), dans la régulation de la transcription (Rouleau et al., 2011), et finalement au cours de la progression tumorale (Karicheva et al., 2016).

1. PARP2 et cycle cellulaire

En utilisant un système d'analyse de la transcription basé sur la détection de l'activité de la luciférase, il a été identifié que la protéine PARP2 possédait une activité de répression de la transcription (Liang et al., 2013). En cartographiant l'implication des domaines de PARP2, les auteurs de cette étude ont identifié le motif signature PARP présent au sein du site catalytique de PARP2 (acides aminés 401 à 451) comme étant responsable de la répression transcriptionnelle. Cette régulation est indépendante de l'activité de PARP2 car elle persiste en présence d'un inhibiteur de PARP ou de la forme inactive de PARP2, dans laquelle la glutamine catalytique est substituée par une alanine (PARP2 E534A). Cette action de PARP2 sur la transcription n'est pas non plus modulée en réponse aux dommages à l'ADN induits par les UV ou l'hydroxyurée. En revanche, l'acétylation de PARP2 par les histones méthyltransférases KAT2A et KAT2B semble impliquée dans cette régulation (Haenni et al., 2008; Liang et al., 2013). En combinant co-immunoprécipitation et immunoprécipitation, il a été observé que PARP2 recrute des histones méthyltransférases ainsi que des histones déacétylases sur son promoteur cible, conduisant à l'instauration d'un contexte chromatinien répresseur de la transcription. En analysant l'effet de PARP2 sur la transcription, il a été observé que PARP2 inhibe l'expression de plusieurs régulateurs importants du cycle cellulaire comme c-MYC, P21, RB (Retinoblastoma-associated protein) ou encore E2F1. Par la suite, en étudiant spécifiquement le rôle de PARP2 sur c-MYC, les auteurs ont démontré que PARP2 se lie spécifiquement sur le promoteur de c-MYC, inhibant sa transcription et ainsi l'entrée de cellules en phase S du cycle cellulaire (voir figure 25). Le recrutement de PARP2 sur le promoteur de c-MYC serait dépendant du répresseur de la transcription YY1 (Liang et al., 2013; Yang et al., 2001). Ainsi, l'absence de PARP2 pourrait être corrélée avec une entrée plus facile des cellules en phase S du cycle cellulaire.

Au sein des erythroblastes murins, il a aussi été observé que l'absence de PARP2 est associée avec une augmentation de la proportion des cellules en phase G2 du cycle cellulaire, suggérant une activation du point de contrôle G2/M (Farres et al., 2015). De plus, une forte augmentation de l'expression de la protéine P21 a été observée lorsque l'expression de PARP2 est réprimée, ce qui pourrait être cohérant avec l'effet suppresseur de transcription de PARP2 sur l'expression de P21 décrit ci-dessus (Liang et al., 2013).

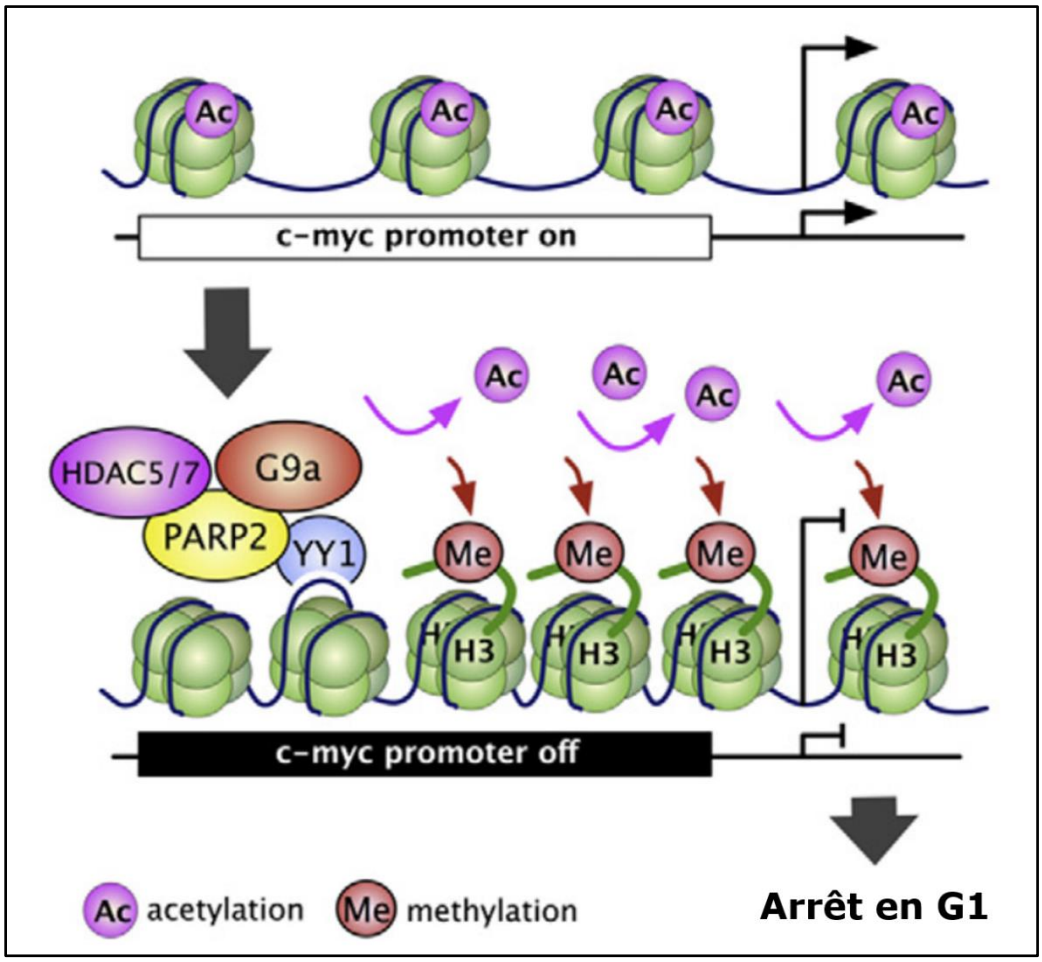


Figure 24 : Mécanisme de répression transcriptionnelle de c-MYC par PARP2. PARP2 est recruté au promoteur de c-myc par l'intermédiaire du répresseur de la transcription YY1 et recrute les histones déacétylases HDAC5 et 9 ainsi que l'histone méthyltransférase permettant d'instaurer un contexte chromatinien défavorable à la transcription de c-MYC. L'action de PARP2 a pour conséquence d'inhiber la transcription de c-MYC et donc de favoriser l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 du cycle cellulaire.

Cependant, l'absence de PARP2 induit un stress réplicatif chronique caractérisé par l'accumulation importante de γH2AX en phase S du cycle cellulaire et par la présence de micronoyaux, ce qui pourrait aussi stimuler l'expression de P21 (Fukuchi et al., 1998). Par ailleurs, les souris déficientes pour PARP2 et P21 meurent très précocement alors que les souris déficientes pour PARP1 et P21 se développent normalement, suggérant un lien spécifique de PARP2 et de P21 (Farres et al., 2015).

Ces études suggèrent donc que PARP2 puisse participer dans la régulation du cycle cellulaire à plusieurs niveaux, soit directement via un rôle dans la régulation de la transcription, soit indirectement comme conséquence de son rôle dans le maintien de la stabilité du génome.

2. PARP2 et architecture de la chromatine

Le rôle de PARP1 dans le remodelage de la chromatine a été largement étudié et a été décrit précédemment (voir page 59). Les fonctions de PARP1 dans le remodelage de la chromatine sont surtout essentielles au cours de la réparation de l'ADN ou encore durant la transcription. Depuis maintenant 35 ans, on sait que la PARylation de l'histone H1 par PARP1 est associée avec la relaxation de la chromatine (Huletsky et al., 1989; Poirier et al., 1982). En revanche, PARP2 pourrait PARyler plus spécifiquement les histones H2A et H2B (Haenni et al., 2008). Un rôle de PARP2 dans le maintien de l'hétérochromatine au niveau des centromères a été proposé (Menissier de Murcia et al., 2003), ainsi que lors de l'inactivation des chromosomes sexuels durant la méiose (Dantzer et al., 2006; Turner, 2007). En effet, la déplétion de PARP2 est associée avec une hypoacétylation de l'histone H4 ainsi qu'avec une hypométhylation de la lysine 9 de l'histone H3, deux marqueurs de l'hétérochromatine. De plus, l'expression de gènes présents sur les chromosomes X et Y est augmentée (Dantzer et al., 2006). Ces phénotypes sont par ailleurs aussi observés dans des cellules mutées pour BRCA1 ou pour H2AX (Fernandez-Capetillo et al., 2003; Xu et al., 2003). De plus, il a été observé que la mortalité spécifiquement des souris femelles *PARP1*$^{+/-}$ PARP2$^{-/-}$ est causée par une instabilité du chromosome X, alors que les males sont viables, suggérant aussi un rôle de PARP2 dans le maintien de l'hétérochromatine (Menissier de Murcia et al., 2003).

PARP2 a aussi été impliqué dans l'organisation de l'hétérochromatine au cours de la différenciation endodermale (Quénet et al., 2008). Dans des cellules murines, PARP2 interagit avec les protéines HP1α et HP1β ainsi qu'avec le facteur de transcription KAP1 et peut PARyler HP1α spécifiquement. PARP1 interagit et PARyle aussi HP1α mais n'est associé que faiblement avec HP1β et KAP1. Comme évoqué précédemment, ces protéines sont aussi impliquées dans l'initiation de la RH au niveau de l'hétérochromatine (voir page 109). Lors de la différenciation endodermale, PARP2 est recruté spécifiquement au niveau de l'hétérochromatine péri-

centromérique et recrute KAP1 en favorisant son interaction avec HP1α. Cette interaction étant essentielle au cours de la différenciation endodermale, la déplétion de PARP2 abolit totalement la différenciation des cellules embryonnaires murines F9 (Cammas et al., 2004; Quénet et al., 2008). De plus, KAP1 qui interagit et est modifié par PARP2, est aussi un substrat important de la kinase ATM, pour promouvoir la RH au niveau de l'hétérochromatine (Noon et al., 2010; White et al., 2012).

Ces données suggèrent donc que PARP2 possède un rôle spécifique dans le maintien de l'hétérochromatine. Il serait intéressant de déterminer si cette fonction de PARP2 pourrait impacter l'efficacité la réparation des dommages de l'ADN au niveau de l'hétérochromatine.

3. PARP2 et ségrégation chromosomique

La préservation de l'intégrité des centromères et des kinétochores est essentielle pour assurer la transmission fidèle de l'information génétique en mitose ou en méiose (Pour revue : Westhorpe and Straight, 2013). L'instabilité chromosomique associée avec un défaut de ségrégation mitotique des chromosomes est une caractéristique commune des cellules cancéreuses (Pour revue : Bakhoum and Compton, 2012). En pro-métaphase, après rupture de l'enveloppe nucléaire, PARP2 s'accumule progressivement au niveau des centromères (Saxena et al., 2002). L'association de PARP2 avec les centromères s'intensifie en métaphase et décline progressivement pour ne plus être détectable par immunofluorescence en télophase. Au cours de l'interphase, le signal nucléaire de PARP2 est enrichit au niveau des nucléoles dans lesquels PARP2 s'accumule (Meder et al., 2005; Saxena et al., 2002). Il a aussi été identifié que PARP2 est présent spécifiquement en périphérie des régions centromériques aussi bien chez la souris que chez l'homme. Lorsque les cellules sont arrêtées en métaphase par l'ajout d'un inhibiteur ou d'un stabilisateur des microtubules, l'accumulation de PARP2 au niveau des centromères est très fortement stimulée, ce qui pourrait suggérer un rôle de PARP2 dans le contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique. Par immunoprécipitation, il a été déterminé que PARP2 interagit avec les protéines centromériques CENPA et CENPB (Centromeric protein A, B) ainsi qu'avec la kinase BUB1 (Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1), qui est impliquée dans le contrôle de l'assemblage du

fuseau mitotique. Ces données suggèrent que PARP2 puisse participer au contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (Saxena et al., 2002).

Ainsi, l'analyse des anaphases issues de cellules de souris déplétées pour PARP2 montre un défaut de ségrégation mitotique important, en particulier lorsque les cellules sont traitées avec un agent alkylant (Menissier de Murcia et al., 2003). De même au cours de la gamétogénèse, l'absence de PARP2 induit aussi un défaut de ségrégation chromosomique lors de la métaphase I des spermacytes murins (Dantzer et al., 2006). Plus spécifiquement, de nombreux chromosomes mal alignés ou présentant une ségrégation retardée est observé. L'alignement et la synapse des chromosomes en méiose est dépendant de la formation de chiasmas qui représentent un site de recombinaison (Gerton and Hawley, 2005; Page and Hawley, 2003). L'absence de PARP2 est associée avec une diminution de plus de deux fois du nombre de foyers MLH1 en métaphase I (DNA mismatch repair protein Mlh1), une protéine de la voie de réparation des mésappariements qui peut être utilisée comme marqueur des chiasmas (Anderson et al., 1999{Dantzer, 2006 #1072)}. Cet effet est encore plus exacerbé en métaphase II. Cette observation indique que PARP2 est impliqué dans la formation ou le maintien des chiasmas au cours de la méiose. PARP2 pourrait donc être impliqué dans les étapes de la RH qui est à l'origine de la formation de ces structures. Alternativement, le rôle décrit de PARP2 dans le maintien de l'hétérochromatine centromérique pourrait aussi expliquer ce défaut de ségrégation chromosomique (Menissier de Murcia et al., 2003).

4. PARP2 et maintien des télomères

Les télomères sont de petites répétitions d'ADN double-brins en tandem présents aux extrémités des chromosomes et maintenus dans certaines cellules par la télomérase (Wong and Collins, 2003). Ces répétitions d'une longueur de 10 à 15 kb sont constituées des 6 nucléotides TTAGGG et présentent une extrémité 3' d'ADN simple-brin qui envahit le duplex télomérique pour former la « D-loop » (Griffith et al., 1999; Morin, 1989). La seconde boucle ainsi formée, est nommée « T-loop ». La protéine TRF2 (Telomeric repeat-binding factor 2) fait partie du complexe « shelterin » et est impliquée dans la maintenance et la stabilité des télomères ainsi que dans la formation de la « t-loop » (Stansel et al., 2001; van Steensel et al., 1998).

Lors de la déplétion de PARP2 chez la souris une augmentation des cassures chromosomiques ainsi que du nombre des extrémités ne présentant pas de répétition télomérique est observée. Ces données suggèrent fortement un rôle de PARP2 dans le maintien de l'intégrité des télomères (Dantzer et al., 2004). Il a été identifié que le domaine N-terminal de PARP2 interagit physiquement avec le domaine myc de TRF2 avec une haute affinité (Dantzer et al., 2004). Le domaine myb de TRF2 est essentiel pour sa liaison aux télomères et pourrait jouer un rôle dans la modulation de la structure de la chromatine (Baker et al., 2009; Hanaoka et al., 2005). Dans cette étude, il a été observé que PARP2 régule négativement l'association de TRF2 avec les télomères de façon dépendante de son activité par deux mécanismes (Dantzer et al., 2004). Tout d'abord, PARP2 PARyle le domaine d'homodimérisation de TRF2 régulant négativement son association avec l'ADN. De plus, l'association des PAR et de PARP2 avec le domaine myb inhibe l'activité de liaison à l'ADN de TRF2. Cette fonction de PARP2 pourrait par exemple faciliter l'accès de la machinerie de la réparation au niveau des télomères, en éjectant TRF2 et en déstabilisant ainsi la structure terminale des télomères.

5. PARP2 et métabolisme

Depuis quelques années, il est apparu évident que PARP2 joue un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique cellulaire. Ces travaux s'appuient essentiellement sur l'étude des souris $PARP2^{KO}$, et ont été très majoritairement menés par Péter Bai et son équipe.

Tout d'abord, il a été identifié que PARP2 faisait partie d'un complexe de transcription contenant la protéine PPARγ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (Bai et al., 2007). La protéine PPARγ est un récepteur nucléaire qui joue un rôle dans l'homéostasie du glucose et des lipides en régulant la transcription de nombreux gènes cibles sous sa forme dimérisée (Cock et al., 2004; Evans et al., 2004). La déplétion de PARP2 diminue l'expression des gènes cibles de PPARγ, ce qui a pour conséquence de limiter la différentiation adipocytaire et l'adipogénèse (Bai et al., 2007).

La protéine SIRT1 est une déacétylase, dont l'activité est directement régulée par le niveau intracellulaire de NAD+. L'activité de SIRT1 régule le métabolisme des lipides et du glucose à de multiples niveaux (Pour revue : Chang and Guarente). Il a été observé que PARP2 se liait

directement sur le promoteur de SIRT1 (NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1) et régulait négativement son expression (Bai et al., 2011a). De plus, les activités consommatrices de NAD+ de PARP1 et de PARP2 sont en compétition avec SIRT1. L'inhibition de PARP1 et de PARP2 ou la déplétion de PARP1 ou PARP2, augmente le niveau intracellulaire de NAD+, ce qui stimule l'activité de SIRT1 (Bai et al., 2011a; Bai et al., 2011b). PARP2 régule donc négativement l'activité de SIRT1 à deux niveaux : directement au niveau transcriptionnel et indirectement de par la modulation du niveau intracellulaire de NAD+.

Chez les souris PARP2^{KO}, l'activation de SIRT1 stimule la déacétylation des cibles de SIRT1, les deux facteurs de transcription FOXO1 (Forkhead box protein O1) et PGC-1α (PPAR-gamma coactivator 1-alpha). L'action de FOXO1 et de PCG-1α stimule la biogénèse mitochondriale ainsi qu'une transition vers le métabolisme oxydatif des lipides (Bai et al., 2011a). L'activation du catabolisme des lipides chez les souris PARP2^{KO} est responsable d'une protection contre l'obésité et d'une résistance à l'insuline induite par un régime riche en graisse. Ce mécanisme est aussi contrôlé en amont par le micro-ARN-149 qui cible directement l'ARNm codant pour PARP2 et qui régule donc négativement l'expression de PARP2 (Mohamed et al., 2014) (voir figure 25). Dans les deux mécanismes présentés ci-dessus, le rôle précis de l'activité de PARP2 n'est pas connu.

En analysant le transcriptome d'une lignée hépatique (HepG2) déplétée pour PARP2, il a été mis en évidence que l'expression de plus de 600 gènes était régulée positivement (25%) ou négativement (75%) par PARP2 (Szántó et al., 2014). Ces données constituent le seul transcriptome associé avec la déplétion de PARP2 et indiquent que PARP2 possède probablement deux rôles distincts dans la régulation de la transcription. De plus, les auteurs ont mis en évidence une action de PARP2 comme régulateur négatif de l'activité du promoteur du gène *SREBP1* (Sterol regulatory element-binding protein 1). L'action de PARP2 sur SREBP1 semble dépendante de son activité de PARylation et module l'homéostasie des lipides. Les souris PARP2^{KO} présentent aussi un niveau plus faible de cholestérol HDL, ce qui pourrait être expliqué par une diminution de l'expression de la protéine ABCA1 (ATP-binding cassette transporter 1), un transporteur intracellulaire du cholestérol.

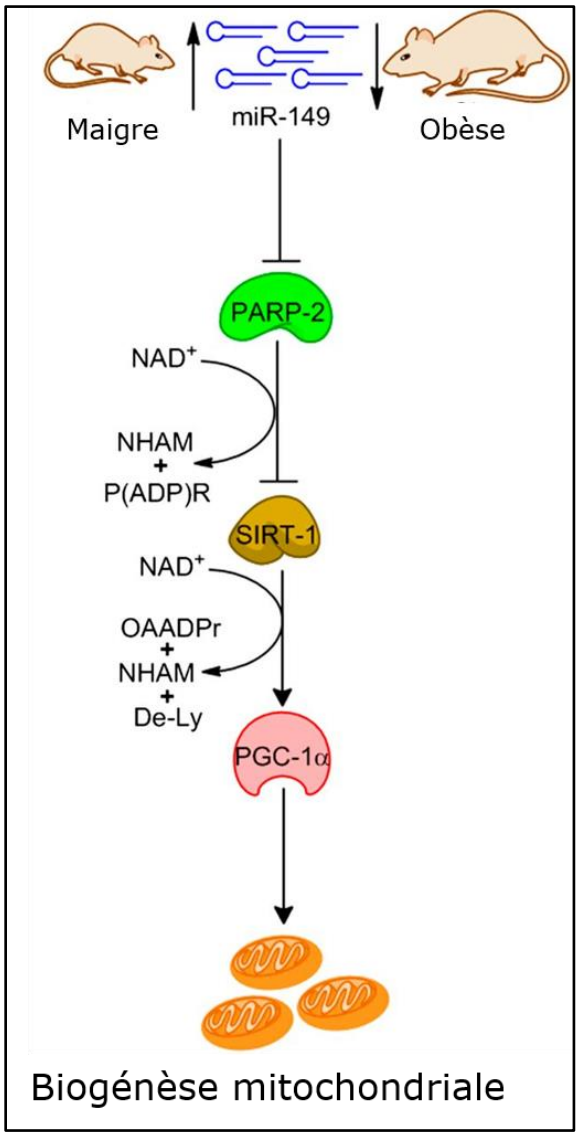


Figure 25 : Régulation de la biogénèse mitochondriale par PARP2. Le niveau d'expression du micro-ARN 149 (miR-149) est régulé en fonction du poids par un mécanisme indéterminé. Le miR-149 inhibe l'expression de PARP2 qui contrôle négativement le niveau d'expression de SIRT1. L'induction de l'activité de SIRT1 stimule la déacétylation de PGC-1α, ce qui induit son activité comme facteur de transcription et stimule la biogénèse mitochondriale (Figure adpatée de Mohamed et al., 2014).

En conclusion, ces études indiquent que PARP2 est impliqué dans le métabolisme lipidique à plusieurs niveaux. Ces données sont intéressantes car l'une des caractéristiques des cellules tumorales est la reprogrammation métabolique en faveur de la glycolyse, un mécanisme nommé, effet Warburg (Vander Heiden et al., 2009; Warburg, 1956). Les études présentées ci-dessus

suggèrent donc que l'inhibition de PARP2 pourrait faciliter la transition vers un métabolisme oxydatif et donc présenter un intérêt anti-tumoral.

Dans la suite du manuscrit, les résultats obtenus au cours de la thèse seront présentés et discutés.

RESULTATS

La section résultats sera divisée en trois parties :

La première partie présentera des travaux qui ont été effectués au début de mon doctorat au sein de l'équipe du Dr. Janet Hall. Ces recherches font suite au travail initié par un doctorant puis post-doctorant du laboratoire qui a analysé l'effet de la déplétion de PARP2 sur le métabolisme global de l'ADP-ribose ainsi que sur la survie cellulaire (Boudra et al., 2015). Ces travaux mettent en lumière un mécanisme de contrôle de l'activité de PARP1, spécifiquement dans une lignée cellulaire. Dans cette étude, j'ai mis en évidence le mécanisme liant la déplétion de PARP2 et le niveau d'ADP-ribose ainsi qu'analysé sa conservation dans d'autres modèles cellulaires. De plus, ces travaux ont servi de fondement de la décision d'analyser le rôle de PARP2 dans la réparation des CDBs de l'ADN, justifiant leur présentation dans ce manuscrit.

Les résultats issus de la première partie, ainsi que des évidences de la littérature, suggèrent que PARP2 participe à la réparation des CDBs de l'ADN. En analysant les fonctions de PARP2 dans ce processus, nous avons mis en évidence un rôle de PARP2 dans la modulation du choix des voies de la réparation des CDBs de l'ADN indépendamment de son activité enzymatique, en limitant l'accumulation de la protéine 53BP1 aux sites de dommages de l'ADN et en stimulant l'initiation de la résection. La version soumise à Nucleic Acids Research de l'article dans lequel je suis premier auteur est présentée.

Finalement, lors de mon arrivée au laboratoire, il avait été mis en évidence que la protéine XRCC1 contenait des sites putatifs de phosphorylation par les CDKs et un mutant pour ses sites de phosphorylations, non phosphorylable *in vitro*, avait été généré. Ainsi, nous avons cherché à déterminer l'impact de ces phosphorylations sur les fonctions de XRCC1. Nous avons mis en évidence que l'interdomaine 1 de XRCC1 est déphosphorylé en réponse aux dommages de l'ADN favorisant l'interaction de XRCC1 avec les PAR et ainsi son recrutement aux sites de dommages à l'ADN. La version soumise à DNA repair de l'article dans lequel je suis premier auteur est présentée.

PREMIERE PARTIE :

PARP2, survie cellulaire et métabolisme des PAR

Introduction

L'observation d'une activité résiduelle de PARylation dans les souris PARP1^{KO} a permis de mettre en évidence la protéine PARP2 (Ame et al., 1999; Shieh et al., 1998b). En réponse aux dommages à l'ADN, l'activité de PARP1 et PARP2 est fortement stimulée. Il est globalement estimé que PARP1 contribue à 85 à 95% du niveau de synthèse des PAR alors PARP2 synthétise les 5 à 15% restants (Ame et al., 1999). Ces résultats indiquent donc que la contribution de PARP2 est variable en fonction des lignées cellulaires ou des organes concernés. L'expression de PARP2 est par ailleurs plus importante dans les tissus à fort niveau de prolifération.

Malgré une contribution relativement faible de PARP2 à l'activité globale de synthèse de PAR, cette protéine est aussi importante que PARP1 pour assurer la cinétique de réparation des CSBs ou pour promouvoir la RH au niveau des fourches de réplication arrêtées (Bryant et al., 2009; Schreiber et al., 2002). Sachant que PARP1 et PARP2 ont la capacité de s'hétérodimériser, ces observations pourraient suggérer un rôle spécifique de l'hétérodimère PARP1/PARP2 et non des homodimères de PARP1 et PARP2 (Schreiber et al., 2002). Cette interaction est indépendante de l'activité des deux protéines puisqu'elle persiste en présence d'un inhibiteur de PARP. De plus, il a été observé que la présence de PARP2 limite l'activation de PARP1 *in vitro*, ce qui pourrait suggérer une compétition entre les deux protéines pour les dommages de l'ADN, ou que la protéine PARP1 soit moins active dans l'hétérodimère PARP1/PARP2 que dans l'homodimère PARP1/PARP1 (Kutuzov et al., 2013b). Ceci pourrait être similaire des fonctions de XRCC1 qui inhibe les activités de PARP1 et PARP2, permettant de les stabiliser aux sites de dommages de l'ADN (Masson et al., 1998b; Schreiber et al., 2002). Ainsi, PARP2 pourrait, indépendamment de son activité enzymatique, moduler l'activité et les fonctions de PARP1.

Résultats

Dans cette étude, nous avons déterminé la contribution relative de PARP2 dans la synthèse intracellulaire de PAR dans différentes lignées cellulaires, spontanément ou en réponse aux dommages de l'ADN. Le rôle de PARP2 dans la promotion de la survie en réponse aux dommages de l'ADN induits par les radiations ionisantes a aussi été déterminé.

Les principaux résultats de cet article sont présentés ci-dessous :

- **La déplétion stable de PARP2 dans la lignée HeLa est associée avec une augmentation de l'activité PARP globale qui induit une accumulation des PAR, spontanément ou en réponse aux dommages de l'ADN.**

- **L'augmentation de l'activité PARP, dans la lignée HeLa déficiente pour PARP2, est causée par une diminution de l'expression de PARG et conduit à une diminution de l'accumulation de PARP1 aux sites de dommages de l'ADN induits par micro-irradiation laser.**

- **Cette fonction de PARP2 dans la régulation de l'activité PARP globale n'est pas conservée au sein d'une lignée de fibroblastes ou d'ostéosarcome.**

- **Malgré une contribution variable de PARP2 dans la régulation du métabolisme des PAR, cette protéine contribue dans les modèles cellulaires analysés, à promouvoir la survie en réponse aux radiations ionisantes.**

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'activité de PARP2 est variable en fonction des lignées cellulaires, et que PARP2 peut moduler l'activité de PARP1 dans certains contextes. Sachant que la contribution de PARP2 dans la réponse aux dommages à l'ADN est conservée dans ces différents modèles, cette étude pourrait suggérer que PARP2 participe à la réponse aux dommages de l'ADN, indépendamment de son activité enzymatique.

Cell. Mol. Life Sci. (2015) 72:1585–1597
DOI 10.1007/s00018-014-1765-2

Cellular and Molecular Life Sciences

RESEARCH ARTICLE

PARP-2 depletion results in lower radiation cell survival but cell line-specific differences in poly(ADP-ribose) levels

Mohammed-Tayyib Boudra · Celeste Bolin · Sara Chiker · Alexis Fouquin · Tomasz Zaremba · Laurence Vaslin · Denis Biard · Fabrice P. Cordelières · Frédérique Mégnin-Chanet · Vincent Favaudon · Marie Fernet · Vincent Pennaneach · Janet Hall

Received: 19 February 2014 / Revised: 15 October 2014 / Accepted: 17 October 2014 / Published online: 22 October 2014
© Springer Basel 2014

Abstract Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) activity contributes to a cells' poly(ADP-ribosyl)ating potential and like PARP-1, has been implicated in several DNA repair pathways including base excision repair and DNA single strand break repair. Here the consequences of its stable depletion in HeLa, U20S, and AS3WT2 cells were examined. All three PARP-2 depleted models showed increased sensitivity to the cell killing effects on ionizing radiation as reported in PARP-2 depleted mouse embryonic fibroblasts providing further evidence for a role in DNA strand break repair. The PARP-2 depleted HeLa cells also showed both higher constitutive and DNA damage-induced levels of polymers of ADP-ribose (PAR) associated with unchanged PARP-1 protein levels, but higher PARP activity and a concomitant lower PARG protein levels and activity. These changes were accompanied by a reduced maximal recruitment of PARP-1, XRCC1, PCNA, and PARG to DNA damage sites. This PAR-associated phenotype could be reversed in HeLa cells on re-expression of PARP-2 and was not seen in U20S and AS3WT2 cells. These results highlight the complexity of the relationship between different members of the PARP family on PAR metabolism and suggest that cell model dependent phenotypes associated with the absence of PARP-2 exist within a common background of radiation sensitivity.

Keywords Base excision repair · Double strand break repair · Single strand break repair · Poly(ADP-ribose) polymerases · PARG · Ionizing Radiation · Neocarzinostatin

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00018-014-1765-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M.-T. Boudra · C. Bolin · S. Chiker · A. Fouquin · T. Zaremba · L. Vaslin · F. P. Cordelières · F. Mégnin-Chanet · V. Favaudon · M. Fernet · V. Pennaneach · J. Hall
Institut Curie, Centre de Recherche, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France

M.-T. Boudra · C. Bolin · S. Chiker · A. Fouquin · T. Zaremba · L. Vaslin · F. Mégnin-Chanet · V. Favaudon · M. Fernet · V. Pennaneach · J. Hall
Inserm, U612, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France

M.-T. Boudra · S. Chiker · A. Fouquin
Faculté de Médecine, Université Paris-XI, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France

D. Biard
Commissariat à l'Energie Atomique, DSV-iMETI-SEPIA, 92265 Fontenay Aux Roses, France

F. P. Cordelières
CNRS, UMR3348, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France

F. P. Cordelières
Plateforme IBiSA d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Institut Curie, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France

J. Hall (✉)
Inserm U612, Institut Curie-Recherche, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France
e-mail: janet.hall@curie.fr

Present Address:
C. Bolin
Department of Biology, The College of Idaho, 2112 Cleveland Boulevard, Caldwell, ID 83605, USA

Introduction

The observation that polymers of ADP-ribose (PAR) could be synthesised in response to DNA-damaging agents in cells from *Poly(ADP-ribose) polymerase 1* (*Parp1*) knockout (KO) mice [1, 2] led to the isolation of a second poly(ADP)ribose polymerase, PARP-2 [1]. In mouse models, the KO of either *Parp1* or *Parp2* has no impact on viability; however, embryonic lethality is seen in the double KO mice suggesting that there is some overlap in the cellular activities of these two members of the PARP family as DNA damage sensors and signal transducers in single strand break repair (SSBR), base excision repair (BER), and double strand break repair (DSB) [3, 4] (for reviews see [5, 6]). Both PARP-1 and PARP-2 are activated through their binding to DNA strand interruptions, and catalyze the transfer of ADP-ribose moieties from NAD^+ to acceptor proteins, resulting in the attachment of linear or branched PAR. PARP-1 and PARP-2 can form homodimers and heterodimers [4] and are themselves targets for poly(ADP-ribosyl)ation with this auto-modification playing a key role in the control of their activity and localization. Both proteins are recruited to sites of laser-induced DNA damage, albeit with different kinetics: PARP-1 was shown to accumulate quickly and transiently, while, in comparison to PARP-1, PARP-2 showed a delayed and persistent accumulation at repair sites in both MEFs and HeLa cells [7]. Based on these kinetic studies and the affinities of PARP-2 compared to PARP-1 for different DNA structures, it was proposed that PARP-2 had a role in the later steps of the BER process [7]. In addition to members of the PARP family, other proteins have a high affinity for poly(ADP-ribosyl)ated proteins or the polymers themselves which is exploited in certain mechanisms, such as DNA repair, for the control of the localization of proteins involved in these processes (see [8–10] and references there in). One such protein is XRCC1 that interacts physically and functionally with practically all the actors of the BER and SSBR pathways [4, 11, 12] and in particular with those implicated in the Short Patch (SP) BER sub-pathway. Intriguingly, although XRCC1 is recruited very slowly to sites of laser-induced DNA damage in MEFs lacking *Parp1* in contrast to its normal recruitment in *Parp2* deleted MEFS [7], XRCC1 negatively regulates the activity of both PARP-1 and PARP-2 by limiting their auto-modification and thus forcing them to reside on the DNA damage site [4]. Taken together these results would suggest that each PARP contributes differently to the SSBR and BER mechanisms. Extensive studies on PARP-1 have allowed its role in these two repair mechanisms to be defined (for a review see [13, 14]) in addition to its involvement in other repair mechanisms such as the alternative non-homologous end-joining (NHEJ) [15–17] and nucleotide excision repair [18, 19]. In contrast, although biochemical studies have revealed that PARP-2, like PARP-1, interacts with the SSBR/BER factors XRCC1, DNA polymerase beta and DNA ligase III [1, 4], its role in both SP and Long Patch (LP) BER sub-pathways remains to be fully elucidated and in particular in human cells.

In the present study, the impact of the stable depletion of PARP-2 in three cell models was examined. In all an increased sensitivity to the cell killing effects of ionizing radiation was detected supporting a role of PARP-2 in DNA strand break repair. However, only in the PARP-2 depleted HeLa cells was a phenotype observed of higher PARP activity and lower PARG protein levels associated with higher basal and DNA induced levels of PAR and sub-maximal recruitment of PARP-1 and BER proteins to sites of laser-induced DNA damage. These results highlight the complexity of the relationship between PARP-1, PARP-2, and PARG on the status quo of polymer levels and suggest that certain phenotypes associated with the depletion of PARP-2 are cell line dependent.

Materials and methods

Cell lines, gene silencing, and drugs

shRNA design and cloning in pEBVsiRNA vectors carrying a hygromycin B resistance cassette and establishment of stable knockdown clones for PARP-1 ($PARP\text{-}1^{KD}$), PARP-2 ($PARP\text{-}2^{KD}$), and PARG ($PARG^{KD}$) and Control clones by selection and amplification of resistant colonies to hygromycin B was carried out as previously described [1, 20, 21]. HeLa cells carrying the pBD650 plasmid that expressed an inefficient shRNA sequence were used as Controls [21]. The RNAi targeted sequences for *parp1* (NM_001618), and *parg* (NM_003631) were nucleotides 2,068–2,086 and nucleotides 2,325–2,343, respectively.

Present Address:
T. Zaremba
AstraZeneca Pharma Poland Sp. z o.o.ul., Postępu 18, 02-676 Warsaw, Poland

Present Address:
F. P. Cordelières
Pôle d'imagerie photonique, Institut François Magendie, Bordeaux Imaging Center, UMS 3420 CNRS-Université de Bordeaux-US4 INSERM, 146 Rue Léo-Saignat, 33077 Bordeaux, France

Present Address:
F. Mégnin-Chanet
Inserm U1030, Gustave Roussy Cancer Campus Grand Paris, 114 rue Edouard-Vaillant, 94805 Villejuif, France

For *parp2* (NM_005484) two sequences were targeted nucleotides 829–847 (clones1,470/1 and 1470/7) and 1,077–1,095 (clone 1,471/13). All HeLa cells clones were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 % FCS, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin in the presence of 125 µg/ml hygromycin B at 37 °C under 5 % CO_2. The control and PARP-2 depleted cell populations derived from the osteosarcoma cells U2OS and the SV40 immortalized fibroblast AS3WT2 cells from a healthy donor [22], were obtained by transfecting the pEBV vectors [21] expressing the control shRNA sequence (U2OS CTL and AS3WT2 CTL cells) or an shRNA that targeted *parp2* at nucleotides 829–847 (U2OS PARP-2^{KD} and AS3WT2 PARP-2^{KD} cells) unless otherwise indicated. Transfected cells were selected by supplementing the standard growth media with 150 µg/ml hygromycin B. All tissue culture reagents were from Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). The neocarzinostatin (NCS) holoprotein, prepared and titrated as described [23], was stored as a sterile 1 mM stock solution in 2 mM sodium formate buffer, pH 4.0, in liquid nitrogen.

Western blotting

Total protein extraction was obtained from the different cell lines using the M-PER (Pierce, Perbio Science, Brebières, France) reagent supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Protein concentrations were measured by the Bradford method using the Bio-Rad protein assay. Following denaturing extracts (40 µg/lane, 95 °C, 5 min) in Laemmli loading buffer and separation on 7.5 % SDS-PAGE gels, proteins were electro-transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5 % non-fat milk for 1 h at room temperature, incubated with the primary antibodies (ALX-210-303-Yuc anti-PARP-2 from ALEXIS Biochemicals, Villeurbanne, France, B01P anti-PARG from Abnova, Heidelberg, Germany, and C2-10 anti-PARP-1 from Trevigen, Gaithersburg, USA) overnight at 4 °C and then with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories, Soham, Cambridgeshire, UK) for 1 h at room temperature. Membranes were probed with an enhanced chemiluminescence reagent and re-hybridized with an anti-α-tubulin antibody clone DM1A (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). For PAR level analysis by western blot 1.5×10^6 cells were harvested in cold PBS and re-suspended in 50 µl of lysis buffer (62.5 mM Tris–HCl pH 6.8, 6 M urea, 10 % glycerol, 2 % SDS, 5 % 2-mercaptoethanol). The DNA was shredded by sonication and the samples were denatured by heating (65 °C, 15 min) prior loading onto a 7.5 % SDS-PAGE gel. After migration proteins were transferred onto Hybond Nylon membrane (GE Healthcare Lifescience, Orsay, France). The membrane was blocked in PBS containing 0.05 % Tween-20 and 5 % non-fat milk for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4 °C with the anti-PAR polyclonal antibody (BD 551813) BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) and then with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Soham, Cambridgeshire, UK) for 1 h at room temperature. Membranes were probed with an enhanced chemiluminescence reagent ECL-prime (GE Healthcare Lifescience, Orsay, France) and the signal was detected using the G: Box Chemi XL1.4 (Syngene, Frederick, USA).

RNA extraction, reverse transcription, and real-time quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted using Rneasy mini kit (Qiagen). 1 µg RNA was reverse transcribed using the High Capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystems). To quantify the relative expression level of *gapdh*, *parp1*, *parp2*, and *parg* Taqman gene expression assays were used (Applied Biosystems). Briefly, cDNA was diluted in Taqman gene expression master mix with the specific Taqman assay for *gapdh* (Hs99999905_m1), *parp1* (Hs00242302_m1), *parp2* (Hs00193931_m1) or *parg* (Hs00608256_m1), and real-time qPCR was carried out using a StepOnePlus (Applied Biosystems). The cycle conditions were 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. The threshold crossing value was obtained for each transcript and normalized to *gapdh*. The relative quantitation of each mRNA was performed using the comparative Ct method. Expression profiles were measured in three independent RNA samples.

Colony formation survival assays

To assess the clonogenic survival Control (1×10^3) and PARP-2^{KD} (2×10^3) cells were plated in 25 cm^2 flasks in triplicate, and allowed to adhere for 4–5 h at 37 °C before treatment. Flasks were then either exposed to ionizing radiation or treated with increasing concentrations of NCS. Aliquots of NCS were thawed just before use and diluted to the required treatment concentration in fresh complete medium adjusted to pH 7.0. The whole treatment was performed in dim light to avoid photo-induced degradation of the drug. Irradiations were carried out at room temperature using an IBL-637 (^{137}Cs) γ-ray irradiator (CIS-Biointernational, Gif-sur-Yvette, France) at a dose rate of 0.7 Gy/min or with a low-energy Philips MCN-323 X-ray generator (200-kVp, 0.3-mm copper and 1-mm aluminium additional filtration, 80-keV effective energy) operating at 21 mA with a dose rate of 1 Gy/min. To assess whether survival differed between the Control and PARP-2^{KD} cells

when irradiated in S-phase, cells were synchronized at the G1–S junction using a double thymidine block and γ-irradiated 2 h after release from the block. Cell cycle progression was monitored by dual parameter flow cytometry using a FACSCalibur cytofluorometer (Becton–Dickinson Biosciences) with BrdUrd pulse labeling (10 μM, 15 min) of S-phase cells as described previously [24]. Colonies were allowed to grow for 10–15 days, before fixing with methanol, staining with Coomassie, and counting. Small colonies (less than 50 cells) were disregarded. The colony count relative to mock-treated cells (S) was adjusted for best fit to the classical linear-quadratic equation ($\mathrm{Ln}\ S = -\alpha D - \beta D^2$) where D is the radiation dose and α and β adjustable parameters characterizing the response. Calculations were made through non-linear least-squares regression taking all data points into account, using Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, Pennsylvania).

Expression plasmids and transfection

pEGFP-PARP-1 and pEGFP-PARP-2, pEGFP-NLS-PCNA, pXRCC1-YFP, pEGFP-PARG plasmids were a kind gift from Drs. V. Schreiber (UMR7175CNRS, ESBS, Illkirch, France), P. Kannouche (UMR 8200 CNRS, Gustave Roussy, Paris XI University, Villejuif, France), and P. Radicella (IRCM, CEA-DSV, Fontenay-aux-Roses, France), respectively. Plasmids were purified using a Macherey–Nagel NucleoBond® PC 500 EF kit (Düren, Germany). For live-cell experiments cells were plated at 50 % confluence onto 25 mm round glass coverslips and then transfected 24 h later using JETPEI (Polyplus transfection, Ozyme, St. Quentin en Yvelines, France) according to the manufacturer's recommendations and cultured for a further 36 h before use.

Live-cell videomicroscopy

The recruitment and the real-time follow-up of the protein of interest was carried out through a Confocal Leica SP5 system attached to a DMI6000 stand using 63×/1.4 objective as previously described [25]. During experiments glass coverslips containing transfected cells were mounted in a Ludin Chamber and maintained at 37 °C. All recordings were made using the appropriate sampling frequency (512 × 512 images, line average of 4 and zooming set to 7.94). DNA damage was generated using a 405 nm laser line (diode) focused onto a single spot of constant size (176 nm) within the nucleus to generate a point of damage with a constant amount of energy. Fluorophores were excited using a 488 nm (EGFP) or 514 nm (YFP) Argon laser line. Recruitment of the protein of interest was then monitored by fluorescence using the same setting as for the pre-damage sequence. Nomarski contrast images were taken in parallel. Images were captured at 2–5 s interval. Cell motion during the acquisition was compensated with the StackReg plugin (Philippe Thévenaz, Biomedical Imaging Group, Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne) and the kinetics of the recruitment of proteins were analyzed under the ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, http://imagej.nih.gov/ij/, 1997–2011) using an in-house developed macro. Data extraction is a semi-automated process where the user is first invited to draw two regions of interest (ROI): a nuclear region and the site of damage. The background ROI is automatically set to the inverse of the nuclear ROI. Intensity from the damage site is corrected for both the observational photo-bleaching and background, and normalized so that its intensity at start-up equals 1: corrected intensity = [(focus intensity(t) − background intensity(t) × focus area/background area) × nuclear intensity(t)][focus intensity (t_0) × nuclear intensity (t_0). The time point of induction of the laser-induced damage is extracted from the normalized curve by determining when the maximum change in intensity is achieved between two successive images. The normalized time course from the damage on was fitted to a mono-exponential recovery of the form $y = a(1-\exp(-k \times t)) + b$ which allows the estimation of the half-time maximum recruitment ($t_{1/2} = (\ln 2)/k$) as well as the expected maximum recruitment ($\max = a+b$).

Immunofluorescence detection of PAR formation

For the detection of polymer formation after exposure to γ-rays cells were plated onto glass coverslips in 6-well plates and 48 h later were exposed to 8 Gy. Three min after the end of the irradiation cells were fixed (4 % formaldehyde in PBS for 25 min). Cells were then washed 3 times with PBS containing 0.1 % Triton X-100, rinsed with PBS alone and re-washed once with PBSMT (PBS with 2 % milk, 0.5 % Triton X-100). After blocking for 30 min at RT with PBSMT, cells were incubated with a primary antibody against poly (ADP-ribose) (Trevigen, clone 10HA, 1/400 dilution in PBSMT) for 1 h at 37 °C. Following washing with PBSMT, slides were incubated with AlexaFluor 488 goat anti rabbit IgG (Molecular Probes, 1/500 dilution in PBSMT) for 1 h at RT. After washing, once with PBSMT and twice with PBS, coverslips were mounted with Vectashield containing DAPI 1.5 μg/ml (Vector Laboratories). Images of fields were acquired automatically on a Leica confocal SP5 system, using its "tile scan" option, with a 63x objective (line average of 4 and zooming set to 4). 300 cells, at least, were analyzed per experimental condition. The global fluorescence intensity by nucleus was quantified in arbitrary units (AU) using Image J software.

Measurements of PARP and PARG activity

Total PARP activity was measured in triplicate as described by Zaremba et al. [26] using 5×10^3 digitonin-permeabilized cells in a reaction mixture containing 350 µM NAD^+ and 10 µg/ml oligonucleotide. After blotting onto a nylon membrane, the PAR was detected following incubation with the primary anti-PAR 10H antibody (ALEXIS Biochemicals, Villeurbanne, France), then with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and finally visualization using the ECL Plus detection kit (GE Healthcare Lifescience, Orsay, France). The luminescent signal was detected and quantified using a G: Box Chemi XL1.4 (Syngene, Frederick, USA). Alternatively, PARP activity of adherent cells was also determined by measuring the incorporation of isotope from ^{32}P-NAD^+ into trichloroacetic acid (TCA)-precipitable proteins, as previously described [27]. Briefly cells were seeded in a 6 well plate 24 h prior to the activity assay, the culture media was then removed and the adherent cells overlaid with 1 ml of reaction buffer (56 mM Hepes pH 7.5, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.01 % digitonin, 200 µg/ml of annealed oligonucleotide (CGGAATTCCG) and 0.125 µM NAD supplemented with 1.25 µCi/ml of ^{32}P-NAD. Following a 10 min incubation at 37 °C, the cells were scraped on ice and the proteins were precipitated by adding 200 µl of ice cold 50 % TCA for 4 h. Cells were pelleted, samples were washed three times with 500 µl of ice cold 5 % TCA and solubilized overnight at 37 °C in 500 µl of 2 % SDS/0.1 N NaOH and the radioactivity counted in a liquid scintillation counter (TriCarb 2910TR, Perkin Elmer, USA). The PARP activity in the PARP depleted cells in the different cell lines is expressed as a % of the incorporated ^{32}P-NAD seen in control cells of the corresponding cell line from at least three independent experiments. PARG activity was measured in cell extracts using a commercially available kit (HT Chemiluminescent PARG Assay Kit, Trevigen) that quantitates the loss of biotinylated PAR from histones according to the manufacturers' instructions.

Statistics

Statistical analyses were performed using StatEL software (AD Science, Paris, France) or the VassarStats website (http://vassarstats.net/).

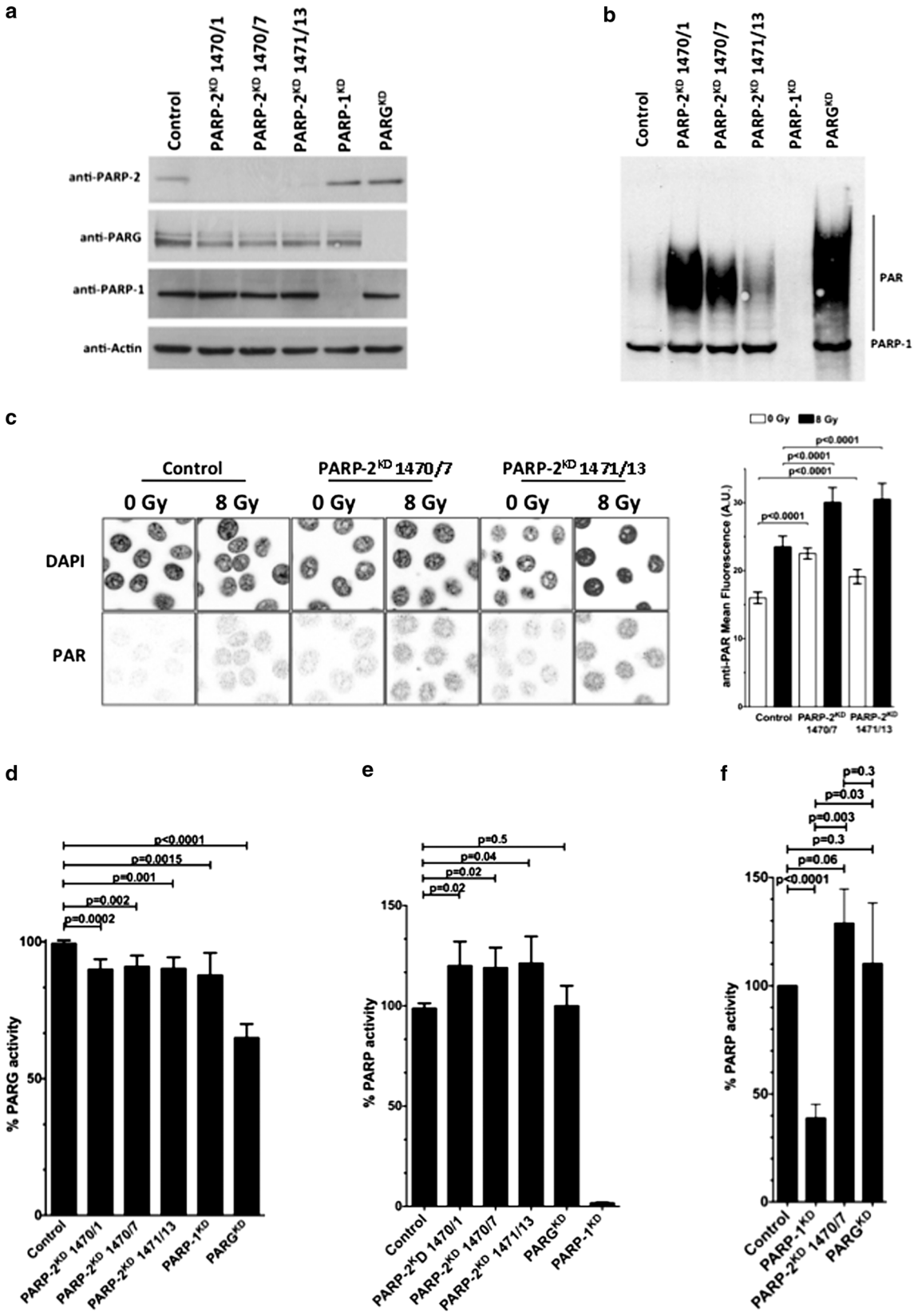
Results

Higher levels of polymer detected in PARP-2 depleted HeLa cells

To investigate the impact of PARP-2 depletion in human cells, we first established three stably depleted PARP-2 (PARP-2^{KD}) HeLa clones using an shRNA expression system that targeted two different nucleotide regions. These PARP-2^{KD} cells were cultivated for more than 80 days in culture with levels of the targeted proteins remaining below 1 % of that seen in Control cells, as assessed by the quantification of western blots. The level of PARP-1 protein was unchanged in the three PARP-2^{KD} clones; however, PARG mRNA (Supplementary Fig. 1a) and protein levels (Fig. 1a) were lower in all 3 clones. PARG protein levels were 53 ± 5 % in PARP-2^{KD} clone 1,470/1, 52 ± 7 % in PARP-2^{KD} clone 1,470/7 and 58 ± 9 % in PARP-2^{KD} clone 1,471/13 compared to Control cells based on four independent protein extracts. A reduction in the level of the PARG protein in HeLa PARP-1^{KD} cells (60 ± 8 % compared to Control cells based on 4 independent protein extracts) (Fig. 1a) was also noted in accordance with other studies [28, 29]. Basal PAR levels, as assessed by western blot (Fig. 1b) or immunofluorescence (Fig. 1c) were significantly higher in the PARP-2^{KD} cells compared to Control cells. Induced PAR levels after exposure to IR were also statistically higher in the PARP-2^{KD} cells (clones 1,470/7 and 1,471/13) compared to the HeLa Control cells ($p < 10^{-5}$, $n = 500$ cells). This higher PAR level was associated with lower PARG activity in the 3 PARP-2^{KD} clones ($p = 0.0002$ to $p = 0.001$ depending on the PARP-2^{KD} clone) (Fig. 1d). Under these same experimental conditions, HeLa PARP-1 ^{KD} cells that have reduced PARG protein levels have a lower PARG activity compared to the Control cells ($p = 0.0015$). We used two different in vitro assays to measure the maximum PARP activity in digitonin-permeabilized cells. With both approaches, we observed that the depletion of PARP-2 resulted in higher levels of PARP activity compared to Control cells (Fig. 1e, f). The difference observed in the PARP activity using a PAR immunodetection-based approach (Fig. 1f) compared to measuring the incorporation of ^{32P}-NAD^+ into TCA-precipitable proteins in the HeLa PARP-1^{KD} cells might reflect a difference in assay sensitivity. This low PARP activity in the PARP-1^{KD} cells is less than the 10–15 % contribution to the poly(ribosy)lating activity of PARP-2 reported in PARP-$1^{-/-}$ MEFs [4] and PARP-$1^{-/-}$ 3T3 cells [1] and may reflect the nature of the DNA substrate used to activate the different PARPs in in vitro assays that assess the total poly(ribosy)lating potential of a cell [1, 26].

The depletion of PARP-2 in HeLa cells modulates the recruitment of PARP-1 and XRCC1

To investigate the impact of higher polymer levels in the HeLa PARP-2 depleted cells, we next investigated the recruitment to and the dissociation from sites of laser-induced damage of fluorescent-tagged PARP-1, XRCC1,


a
Control
PARP-2KD 1470/1
PARP-2KD 1470/7
PARP-2KD 1471/13
PARP-1KD
PARGKD
anti-PARP-2
anti-PARG
anti-PARP-1
anti-Actin
b
PAR
PARP-1
c
Control
PARP-2KD 1470/7
PARP-2KD 1471/13
0 Gy
8 Gy
DAPI
PAR
anti-PAR Mean Fluorescence (A.U.)
p<0.0001
d
% PARG activity
p=0.0015
p=0.001
p=0.002
p=0.0002
e
% PARP activity
p=0.5
p=0.04
p=0.02
p=0.02
f
p=0.3
p=0.03
p=0.003
p=0.06

◀**Fig. 1** Modification of PAR levels, PARG, and PARP activity in HeLa PARP-2^{KD} cells. **a** Representative levels of expression of the PARP-2, PARG, and PARP-1 proteins in the different HeLa cell cultures as assessed by western blotting. **b** Polymer levels as assessed by western blotting from untreated cell cultures. **c** Representative images of PAR immunofluorescence in Control cells or PARP-2^{KD} cells before and after exposure to 8 Gy of γ-rays IR and the quantification of the PAR staining. Data represents the mean ± SD based on the fluorescence intensity in 500 cells/treatment group in two independent experiments. **d** PARG activity measured in protein extracts from the different cell lines, expressed as a % of the activity seen in the Control cells. Data are median ±95 % confidence interval for four independent experiments in triplicate and shows that in PARP-2^{KD} cells PARG activity is significantly reduced compared to the Control cells. **e** Maximum PARP activity in permeabilized cells expressed as a % of the activity detected in Control cells showing that the PARP-2^{KD} clones have a significantly higher activity that the Control cells. Data are median ±95 % confidence interval for three independent experiments in triplicate. **f** PARP activity in the HeLa PARP-2^{KD} clone 1,470/7 assessed by the incorporation of isotope from ^{32}P-NAD^{+} into trichloroacetic acid-precipitable proteins, expressed as a % of the activity detected in Control cells, was higher than in Control cells. Data represents the mean ± SD of four independent experiments

PCNA, and PARG in real time. The EGFP-PARP-1 protein shows a rapid and transient accumulation at the site of damage immediately after micro-irradiation in Control cells (Fig. 2a) as previously described by several groups [7, 25, 30, 31]. In contrast, EGFP-PARP-1 shows a slower and reduced recruitment in the three HeLa PARP-2 depleted cells (57 s for PARP-2^{KD} clone 1,470/1, 58 s for PARP-2^{KD} clone 1,470/7 and 62 s for PARP-2^{KD} 1,471/13 with a maximum relative intensity of 2.43 ± 0.07, 2.32 ± 0.07, and 2.26 ± 0.08, respectively, vs. a maximum relative intensity of 2.96 ± 0.07 reached at 50 s for Control cells $p < 10^{-3}$) (Fig. 2a). These results would suggest that in HeLa cells PARP-2 is necessary for a maximal PARP-1 recruitment to DNA damage sites.

Under the same experimental conditions, XRCC1-YFP recruitment was initially slower and reached lower maximal levels in all three HeLa PARP-2^{KD} clones compared to Control cells (maximal relative spot intensity reached was 4.40 ± 0.16 in PARP2^{KD} clone 1,470/1 ($n = 13$),

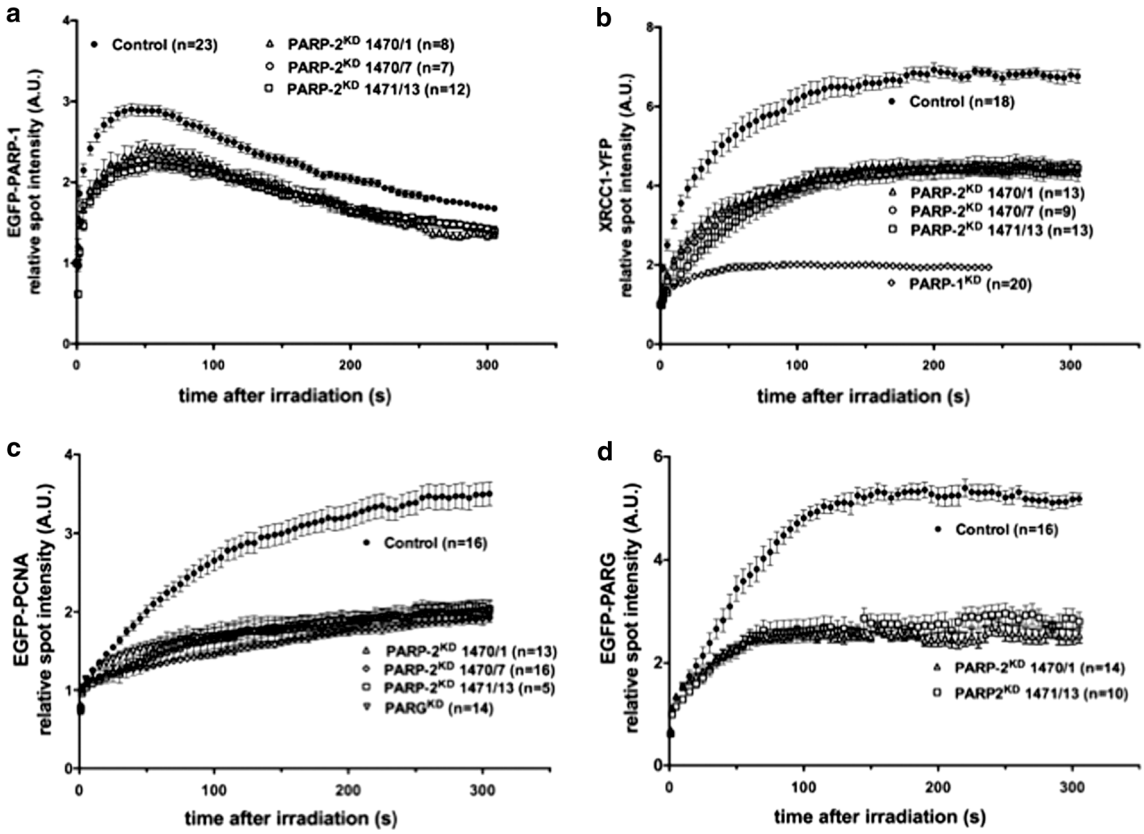


Fig. 2 Recruitment of PARP-1, XRCC1, PCNA, and PARG in HeLa Control and PARP-2^{KD} cells to UVA laser-induced damage sites. Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of **a** EGFP-PARP-1, **b** XRCC1-YFP, **c** EGFP-PCNA, and **d** EGFP-PARG recruitment in Control cells (*closed circles*) and in the three PARP-2^{KD} clones (*open triangles*, *circles*, and *squares*). For comparative purposes the recruitment of XRCC1-YFP in HeLa PARP-1^{KD} cells (*panel b*) and EGFP-PCNA in HeLa PARG^{KD} cells (*panel c*) are shown. Data represents mean relative spot intensity ± SEM, $n = 5$–23 individual cells from a minimum of two independent experiments

4.52 ± 0.15 in PARP2^{KD} clone 1,470/7 ($n = 9$) and 4.34 ± 0.18 in PARP2^{KD} 1,471/13 ($n = 13$) vs. 6.86 ± 0.16 ($n = 18$) for Control cells). This reduction was not as marked as seen for XRCC1-YFP recruitment in PARP-1^{KD} cells (maximal relative spot intensity reached was 1.83 ± 0.06) (Fig. 2b) but would suggest that the presence of PARP-2 is necessary to obtain the recruitment profile of XRCC1 seen in Control cells. The reasons behind this reduction remain unclear: it could be related to the lower PARP-1 recruitment that impacts directly on XRCC1 recruitment or that the higher nuclear PAR levels in these PARP-2^{KD} cells could impede XRCC1 recruitment to DNA damage sites. A reduced XRCC1 recruitment was also seen in Cdk5-depleted cells that have elevated basal polymer levels [32]. Another possibility is that PARP-2 itself is involved in the recruitment of XRCC1 as PARP-2 has been shown to interact with XRCC1 [4] and thus in its absence, XRCC1 recruitment would be reduced.

In addition to a reduction in the recruitment of these key BER/SSBR proteins in the absence of PARP-2 in this HeLa cell model, PARP-2 depletion significantly reduced ($p < 0.0001$) the recruitment of GFP-PCNA with recruitment not reaching the levels seen in Control cells (relative spot intensity reached at 300 s was 2.03 ± 0.11 in PARP2^{KD} clone 1,470/1 ($n = 13$), 1.95 ± 0.05 in PARP2^{KD} clone 1,470/7 ($n = 16$), and 2.06 ± 0.08 in PARP2^{KD} 1,471/13 ($n = 5$) vs. 3.53 ± 0.24 ($n = 16$) for Control cells) (Fig. 2c).

It has been previously shown that the recruitment of PARG to DNA damage sites depends not only on PARP-1 and PAR synthesis but also on the interaction of PARG with PCNA [31, 33]. As predicted from the reduced PCNA recruitment observed the maximal levels of EGFP-PARG

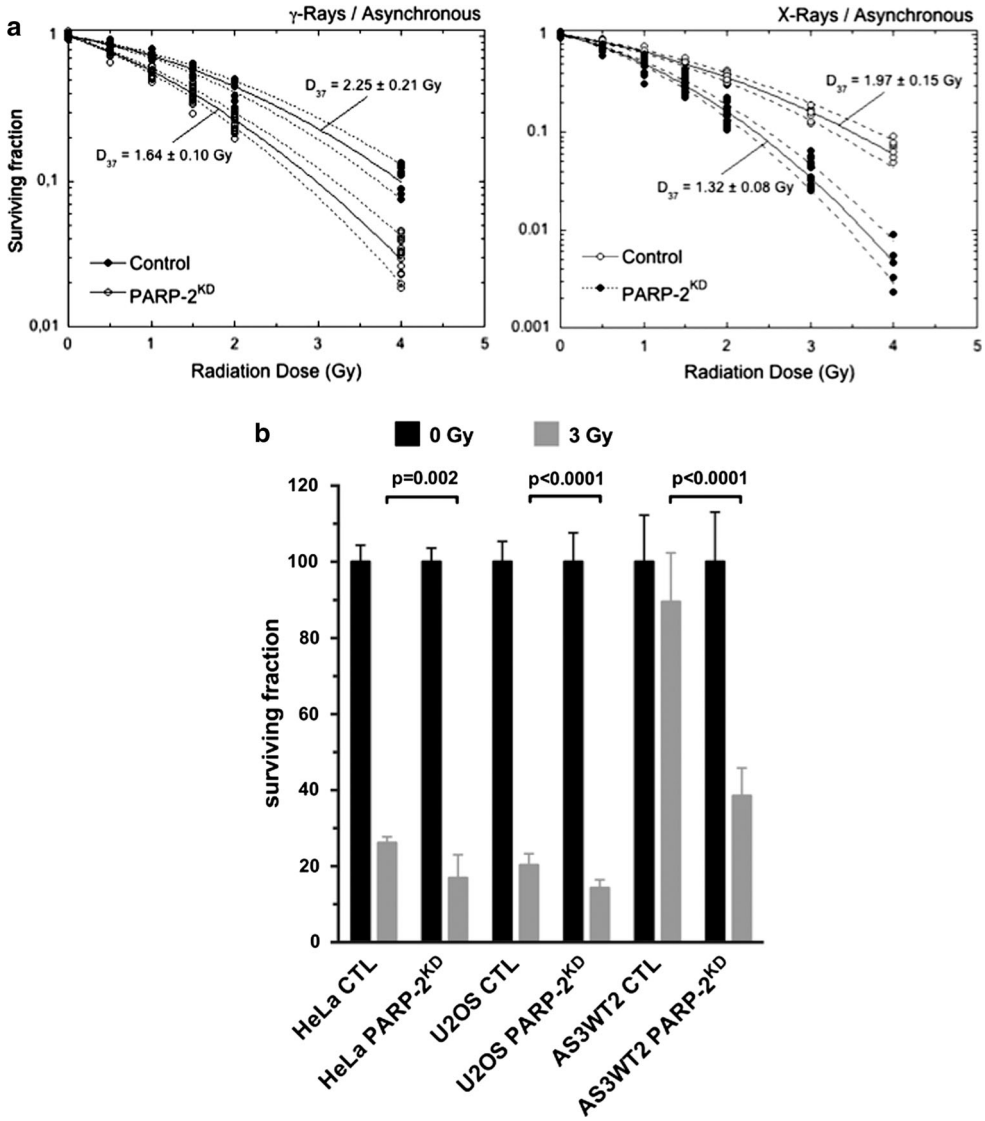


Fig. 3 Impact of the depletion of PARP-2 on radiation susceptibility. Clonogenic assays of Control (*open symbols*) and HeLa PARP-2^{KD} cells (*closed symbols*) exposed to increasing doses of **a** γ-rays or X-rays were performed with asynchronous cell cultures. Data represents mean ± SD from at least two independent experiments in triplicate. The *solid lines* represent the curves drawn for best fit of data to the linear-quadratic equation (see "Materials and methods"). The *dotted lines* mark the upper and lower limits of the confidence interval drawn from the SDs calculated for the α and β parameters of the linear-quadratic model. **b** Clonogenic cell survival was assessed after exposure to 3 Gy γ-rays in HeLa; U2OS and AS3WT2 cells in which PARP-2 was stably depleted. Statistically lower survival was seen compared to the parental line on the depletion of PARP-2. Data represents the mean ± SD of four independent experiments

recruitment at the damage site plateaued in the HeLa PARP-2^{KD} cells was about 50 % of the levels seen in the Control cells post-irradiation (maximum relative spot intensity 5.38 ± 0.18 in Control ($n = 16$), 2.55 ± 0.02 in $PARP2^{KD}$ clone 1,470/1 ($n = 14$) and 2.80 ± 0.02 in $PARP2^{KD}$ 1,471/13 ($n = 10$)) (Fig. 2d). A similar kinetic profile was also seen for the recruitment of EGFP-PCNA in a $PARG^{KD}$ HeLa cell line showing that PARG also is required for PCNA recruitment (Fig. 2e).

The PARP-2 protein expression was restored by cultivating the PARP-2^{KD} cells in the absence of hygromycin B for 20 days with a concomitant increase in the expression of the PARP-2 and PARG proteins (Supplementary Fig. 2a). In addition, the increase in PARP activity (Supplementary Fig. 2b), the higher levels of basal polymer levels (Supplementary Fig. 2c) and the reduced GFP-PARP-1 recruitment to sites of laser-induced DNA damage (Supplementary Fig. 2d) were all restored when the cells were grown in the absence of the selective agent hygromycin. Based on the phenotype observed in HeLa cells, it would suggest that PARP-2 plays a role in the regulation of the PARG protein expression and the regulation of PAR metabolism.

PARP-2 depleted cells are sensitive to DNA single and double strand breaks

We next examined the effect of the depletion of PARP-2 on clonogenic survival after exposure of cells to agents that produce DNA strand breaks (Fig. 3a). In asynchronous cultures, the three HeLa PARP-2^{KD} clones showed a significant increase in sensitivity ($p < 10^{-4}$) to the cell killing effects of both ^{137}Cs γ -rays (D_{37}CTL/D_{37}PARP-2^{KD} = 1.37 ± 0.21) and 200 kV X-rays (D_{37}CTL/D_{37}PARP-2^{KD} = 1.49 ± 0.20) with 200 kV X-rays being more efficient than ^{137}Cs γ -rays as expected from their known relative biological efficiency, namely, 1.30 vs. 1.07, respectively, relative to ^{60}Co radiation [34, 35]. Both Control and PARP-2^{KD} cells synchronized in S-phase were more radioresistant than asynchronous cells but the ratio of their D_{37} values (D_{37}CTL/D_{37}PARP-2^{KD} = 1.60 ± 0.35 for ^{137}Cs γ-rays) was not significantly different from that for asynchronous cultures (Supplementary Fig. 1b). These results distinguish cells depleted in PARP-2 from those depleted in PARP-1, as the S-phase radioresistance is negligible in PARP-1 depleted cells as shown by the ratio of the D_{37} values for S-phase vs. asynchronous cultures of 1.04 ± 0.27 for PARP-1^{KD} cells (Supplementary Fig. 1c) compared to 1.39 ± 0.21 for Control cells and 1.19 ± 0.17 for PARP-2^{KD} cells. PARP-2^{KD} clones compared to control cells were also significantly more sensitive to the cell killing effects of NCS, a protein antibiotic that reportedly induces DSBs only in DNA [36, 37], ($[NCS]_{37}$CTL/$[NCS]_{37}$PARP-2^{KD} = 1.39 ± 0.22) (Supplementary Fig. 1b). Sensitivity to NCS has been previously reported for cells depleted in DNA-PKcs [32], ATM [38] and Artemis [39] but not in HeLa PARP-1^{KD} cells or PARP-1^{KO} MEFs [32, 36]. These results raise the intriguing possibility that the decreased PARG expression and increased PAR level in PARP-2 depleted cells impacts not only on SSB and BER pathways but also on the processing of DNA DSBs in mammalian cells.

The phenotype of PARP-2 depleted U20S and AS3WT2 cells

To assess whether a similar phenotype was seen in other cell models when PARP-2 was depleted, we used the same shRNA expression system to stably deplete PARP-2 in U2OS and AS3WT2 cells. The U2OS and AS3WT2 cells were chosen because they express similar levels of the PARP2 mRNA as HeLa Control cells (data not shown). The radiation sensitivity was assessed after exposure to 3 Gy using a clonogenic survival assay. The depletion of PARP-2 in all three models (Fig. 4a) resulted in as significant reduction in cell survival compared to PARP-2 expressing HeLa Control cells (26 % compared to 16 %, $p = 0.002$), U2OS (20 % compared to 14 %, $p < 0.0001$) and AS3WT2 (89 % compared to 38 %, $p < 0.0001$) (Fig. 3a). However, no impact on PARG protein levels (Fig. 4a, b), PARP activity (Fig. 4c) or the recruitment of EGFP-PARP-1 and XRCC1-YFP to sites of laser-induced DNA damage sites (Fig. 4d) were noted in either model in direct contrast to the PAR dependent phenotype seen in the PARP-2 depleted HeLa cell line. These results would suggest that the direct interaction of PARP-1 and XRCC1 with PARP-2 [4] could not account for the reduced recruitment observed of both proteins seen in the HeLa PARP-2^{KD} cells. The PARP activity measured in the two model cell lines PARP-2 depleted is not different than the PARP activity measured in the respective control cells expressing the PARP-2 protein ($p < 0.5$ and $p < 0.4$, respectively) (Fig. 4d). These observations suggest that unlike the situation in murine cells where PARP-2 depletion results in a reduced PARP activity measured by a similar method [1, 40] (Fig. 4d), PARP-2 depletion in human cells does not reduce PARP activity.

Discussion

Poly(ADP-ribosyl)ation regulates the activity of many proteins involved in different cellular processes including DNA repair and cell death. While the involvement of PARP-1 in both the BER and SSBR pathways as well as DNA DSB repair has been examined, the role of PARP-2

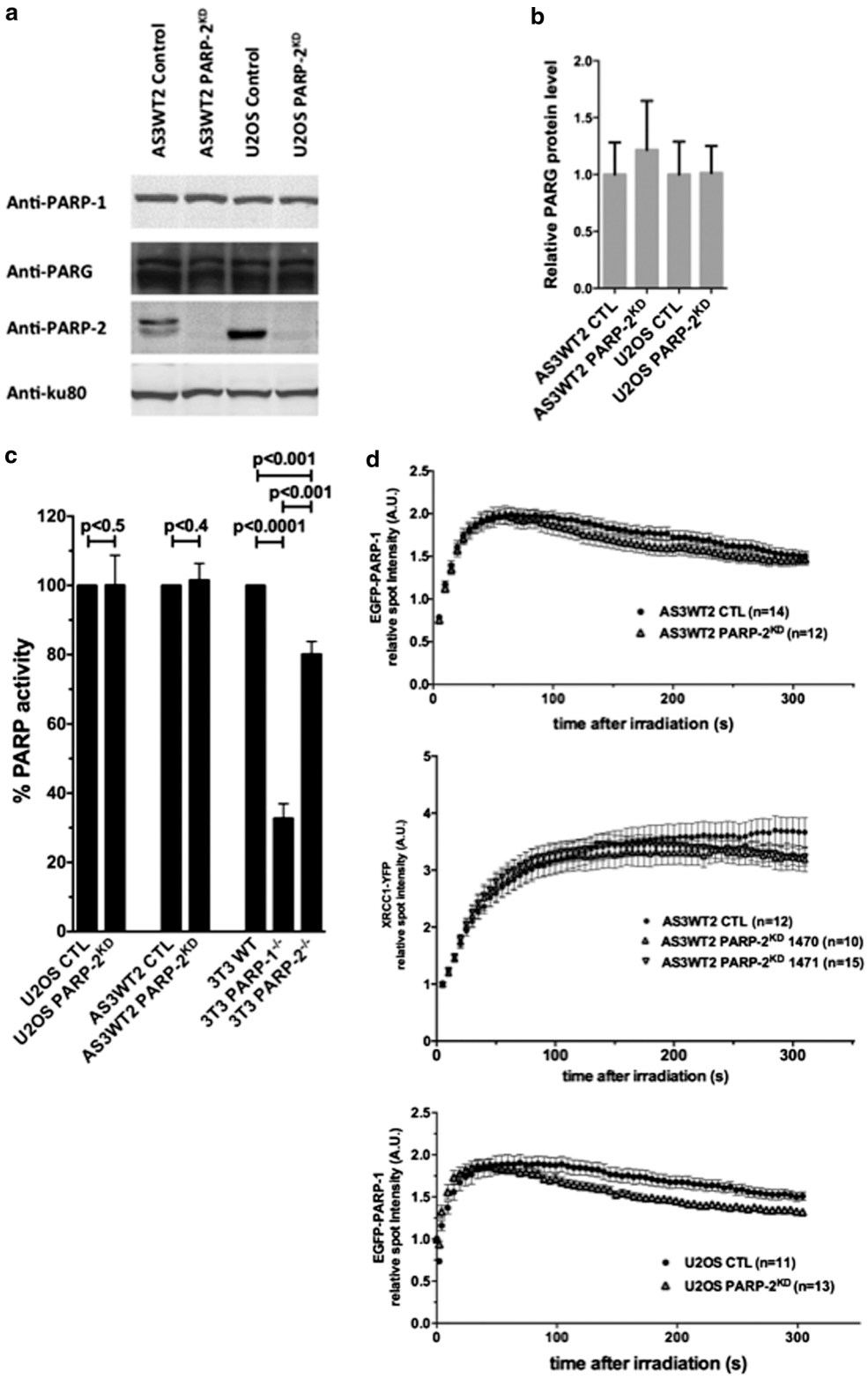


Fig. 4 Impact of the depletion of PARP-2 in U2OS and AS3WT2 cells The depletion of PARP-2 in U2OS and AS3WT2 cells had no impact on the relative PARG protein level compared to the parental line transfected with a control shRNA **a** was quantified **b** from three independent extracts, or on **c** PARP activity as measured by the incorporation of isotope from ^{32}P-NAD^{+} into trichloroacetic acid-precipitable proteins, or **d** the recruitment of EGFP-PARP-1 or XRCC1-YFP to sites of laser-induced DNA damage sites in AS3WT2 PARP-2^{KD} cells or EGFP-PARP-1 in U2OS PARP-2^{KD} cells. The PARP-2 depleted cells used were generated using the shRNA that targeted *PARP2* at nucleotides 829–847 (AS3WT2 PARP-2^{KD} 1470) or at nucleotides 1,077–1,095 (AS3WT2 PARP-2^{KD} 1471)

in these processes is less well characterized. In the present study, we have found that the depletion of PARP-2 using a shRNA construct results in radiosensitivity in the three models examined but that PARP-2 depleted Hela cells have additional phenotypes that reflect a change in the status quo of the polymer levels that is not seen in the other two models examined. The PAR-related phenotype seen in HeLa cells is robust: it was seen in 3 independent clones cultured for over 20 passages and the concomitant changes associated with increased PAR levels can be reversed on re-expression of PARP-2.

In the HeLa PARP-2^{KD} cells the increased PAR levels are associated with a small but reproducible increase in PARP activity and a decrease in PARG activity associated with a decrease in PARG protein and mRNA levels. An increase in PARP activity in the absence of PARP-2 has previously been reported in thymocytes and stimulated B lymphocytes from *Parp2*$^{-/-}$ mice with a 20 % increase in PAR synthesis compared to Control cells [17, 41, 42]. In contrast while no changes in PARP activity were seen in the U2OS and AS3WT2 cells when PARP-2 was depleted reduced PAR activity was found in PARP2$^{-/-}$ immortalized 3T3 fibroblasts (this study and [1]) and in PARP2$^{-/-}$ MEF cells [1, 4] and PARP-2 depleted MOVAS cells [40]. These results suggest that additional mechanisms exist that regulate PARP activity that involve PARP-2 and appear to be cell type specific. The observation that the in vitro PAR synthesis rate catalyzed in the presence of both PARP-1 and PARP-2 was lower than in the case of PARP-1 alone [4, 43], could suggest the PARP-1/PARP-2 homodimer can downregulate PARP-1 activity or that following activation through binding to DNA structures the poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 by PARP-2 impacts on its enzymatic activity [4, 43].

The HeLa PARP-2^{KD} cells also show a robust reduction in PARG expression. It has also been reported that the constitutive suppression of the *Parg* gene in cells using a shRNA approach caused the accumulation of PAR levels [1, 28] and that *Parp1* gene expression and PARP-1 protein expression is downregulated by the knockdown of the *Parg* gene [44, 45]. The balance between these proteins has been shown to influence transcriptional regulation of many genes with PARP-1 and PARG enzymatic activities required for some but not all target genes [29]. Our results would suggest that the impact of PARP-2 on the expression of PARG at the transcriptional level may be cell type specific.

Taken together the results from the three cell models highlight the complex interplay between the PARP-1, PARP-2, and PARG proteins both in terms of their expression and enzymatic activity. Why this PAR-related phenotype is only seen in the HeLa cells and not in the AS3WT2 or U20S cells is not clear. One possibility is that it is the balance between the expression of the 3 proteins or their mRNAs that is essential for the observed response and that the depletion of PARP-2 perturbs this balance triggering other changes. In the AS3WT2 or U20S cells, although the levels of the PARG transcript and protein are lower than the reduced level seen after PARP-2 depletion in HeLa cells this lower level is not sufficient to cause an overall increase in polymer levels suggesting that additional factors control this *status quo*. Transcriptome analysis of the different PARP-2 depleted clones could potentially help to unravel these observations. PARP-1 activity can also be modulated by post-translational modifications. For instance, we have previously shown in HeLa cells that the depletion of the Cdk5 kinase is associated with increased PARP-1 activity resulting in increased polymer levels [32]. Whether differences in such modifications could be underlying these variations could be addressed using an analysis of the PARP-1 protein in the different models by mass spectrometry.

One consequence of PARP-2 depletion that was shared between the three lines was an increased sensitivity to the cell killing effects of IR. While this has not yet been further investigated in the AS3WT2 or U20S cells, the observation that HeLa PARP-2^{KD} cells show S-phase radioresistance distinguishes them from HeLa PARP-1^{KD} cells [25, 36]. This would suggest that PARP-2 might be implicated in not only the processing of DNA SSBs but also of DSBs generated throughout the cell cycle supported by the observation that the HeLa PARP-2^{KD} cells were sensitive to NCS. Such a role for PARP-2 is supported from animal models. In *Parp2*$^{-/-}$ MEF model, a significant delay in DNA strand break sealing after exposure to MNU, as measured by the Comet assay, was found and *Parp2* KO mice and *Parp2*$^{-/-}$ mouse 3T3 fibroblasts were sensitive to the cell killing effects of IR [3, 46]. While PARP-1 clearly has a role in replication fork restart by homologous recombination and NHEJ (see Robert et al. [13]), the experimental evidence for a role of PARP-2 in DSB repair is sparse [17, 42]. PARP-2 was reported to suppress translocations between c-myc and IgH, which are induced during class switching [17] and impaired T cell receptor rearrangements in mice [42]. In addition, it cannot be ruled out that the increased sensitivity is not, at least in part, a consequence of the deregulated PAR levels found in the absence of PARP-2 that impacts on the choice of DNA repair pathways.

In conclusion, these results highlight the cell type and species-specific phenotypes associated with the depletion of PARP-2 and identify a common feature namely radiation sensitivity. Whether the differences reflect the presence or absence of other enzymatic activities that might modulate overall PARP activity remains to be established but clearly care must be taken on the extrapolation of cellular phenotypes between different cell models.

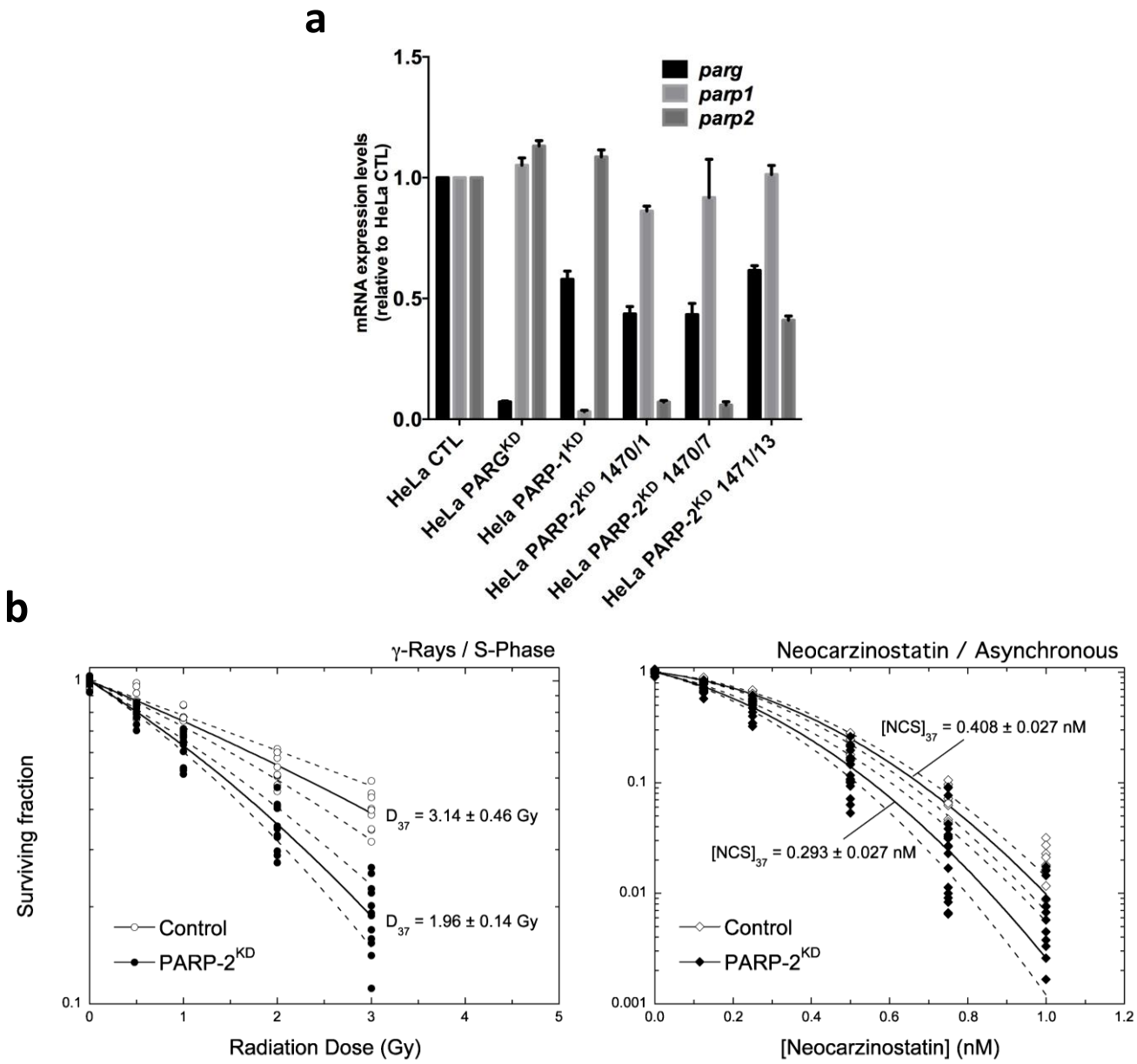
Acknowledgments Research in Inserm U612 is supported by funding from Institut Curie and Inserm. MTB had a PhD fellowship from the Presidency of the University of Paris-Sud XI, SC and AF have PhD fellowships from the French Ministry of Research. CB, TZ and MTB were supported by Institute Curie's International Post-doctoral fellow program and TZ by a fellowship from the Fondation Pierre-Gilles de Gennes. The assistance of members of the Institut Curie Small Animal Radiation Platform is gratefully acknowledged.

References

1. Ame JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Hoger T, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1999) PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(-ADP-ribose) polymerase. J Biol Chem 274(25):17860–17868
2. Shieh WM, Ame JC, Wilson MV, Wang ZQ, Koh DW, Jacobson MK, Jacobson EL (1998) Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. J Biol Chem 273(46):30069–30072
3. Menissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, Schreiber V, Ame JC, Dierich A, LeMeur M, Sabatier L, Chambon P, de Murcia G (2003) Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. EMBO J 22(9):2255–2263
4. Schreiber V, Ame JC, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. J Biol Chem 277(25):23028–23036
5. Beck C, Robert I, Reina-San-Martin B, Schreiber V, Dantzer F (2014) Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3. Exp Cell Res. doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.003
6. Yelamos J, Schreiber V, Dantzer F (2008) Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. Trends in mol med 14(4):169–178
7. Mortusewicz O, Ame JC, Schreiber V, Leonhardt H (2007) Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. Nucleic Acids Res 35(22):7665–7675
8. Althaus FR, Kleczkowska HE, Malanga M, Muntener CR, Pleschke JM, Ebner M, Auer B (1999) Poly ADP-ribosylation: a DNA break signal mechanism. Mol Cell Biochem 193(1–2):5–11
9. Malanga M, Althaus FR (2004) Poly(ADP-ribose) reactivates stalled DNA topoisomerase I and Induces DNA strand break resealing. J Biol Chem 279(7):5244–5248
10. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. Nat Rev 7(7): 517–528
11. Caldecott KW (2003) XRCC1 and DNA strand break repair. DNA Repair 2(9):955–969
12. Keil C, Grobe T, Oei SL (2006) MNNG-induced cell death is controlled by interactions between PARP-1, poly(ADP-ribose) glycohydrolase, and XRCC1. J Biol Chem 281(45):34394–34405
13. Robert I, Karicheva O, Reina San Martin B, Schreiber V, Dantzer F (2013) Functional aspects of PARylation in induced and programmed DNA repair processes: preserving genome integrity and modulating physiological events. Mol Aspects Med 34(6): 1138–1152. doi:10.1016/j.mam.2013.02.001
14. Woodhouse BC, Dianov GL (2008) Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. DNA Repair 7(7): 1077–1086
15. Audebert M, Salles B, Weinfeld M, Calsou P (2006) Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. J Mol Biol 356(2):257–265
16. Mansour WY, Rhein T, Dahm-Daphi J (2010) The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. Nucleic Acids Res 38(18):6065–6077
17. Robert I, Dantzer F, Reina-San-Martin B (2009) Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. J Exp Med 206(5):1047–1056. doi:10.1084/jem.20082468
18. Ghodgaonkar MM, Zacal N, Kassam S, Rainbow AJ, Shah GM (2008) Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase-1 reduces host cell reactivation of a UV-damaged adenovirus-encoded reporter gene in human dermal fibroblasts. DNA Repair 7(4):617–632. doi:10.1016/j.dnarep.2008.01.001
19. Pines A, Vrouwe MG, Marteijn JA, Typas D, Luijsterburg MS, Cansoy M, Hensbergen P, Deelder A, de Groot A, Matsumoto S, Sugasawa K, Thoma N, Vermeulen W, Vrieling H, Mullenders L (2012) PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. J cell Biol 199(2):235–249. doi:10.1083/jcb.201112132
20. 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
21. Biard DS, Despras E, Sarasin A, Angulo JF (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
22. Le Chalony C, Hoffschir F, Gauthier LR, Gross J, Biard DS, Boussin FD, Pennaneach V (2012) Partial complementation of a DNA ligase I deficiency by DNA ligase III and its impact on cell survival and telomere stability in mammalian cells. Cell Mol Life Sci 69(17):2933–2949. doi:10.1007/s00018-012-0975-8
23. Favaudon V (1983) Gamma-radiolysis study of the reductive activation of neocarzinostatin by the carboxyl radical. Biochimie 65(11–12):593–607
24. Fernet M, Megnin-Chanet F, Hall J, Favaudon V (2010) Control of the G2/M checkpoints after exposure to low doses of ionising radiation: implications for hyper-radiosensitivity. DNA Repair 9(1):48–57. doi:10.1016/j.dnarep.2009.10.006
25. Godon C, Cordelieres FP, Biard D, Giocanti N, Megnin-Chanet F, Hall J, Favaudon V (2008) PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. Nucleic Acids Res 36(13): 4454–4464
26. Zaremba T, Thomas HD, Cole M, Coulthard SA, Plummer ER, Curtin NJ (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) pharmacogenetics, activity and expression analysis in cancer patients and healthy volunteers. Biochem J 436(3):671–679. doi:10.1042/BJ20101723
27. Virag L, Scott GS, Cuzzocrea S, Marmer D, Salzman AL, Szabo C (1998) Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly (ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. Immunology 94(3):345–355
28. Erdelyi K, Bai P, Kovacs I, Szabo E, Mocsar G, Kakuk A, Szabo C, Gergely P, Virag L (2009) Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells. FASEB J 23(10):3553–3563. doi:10.1096/fj.09-133264
29. Frizzell KM, Gamble MJ, Berrocal JG, Zhang T, Krishnakumar R, Cen Y, Sauve AA, Kraus WL (2009) Global analysis of transcriptional regulation by poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase in MCF-7 human breast cancer

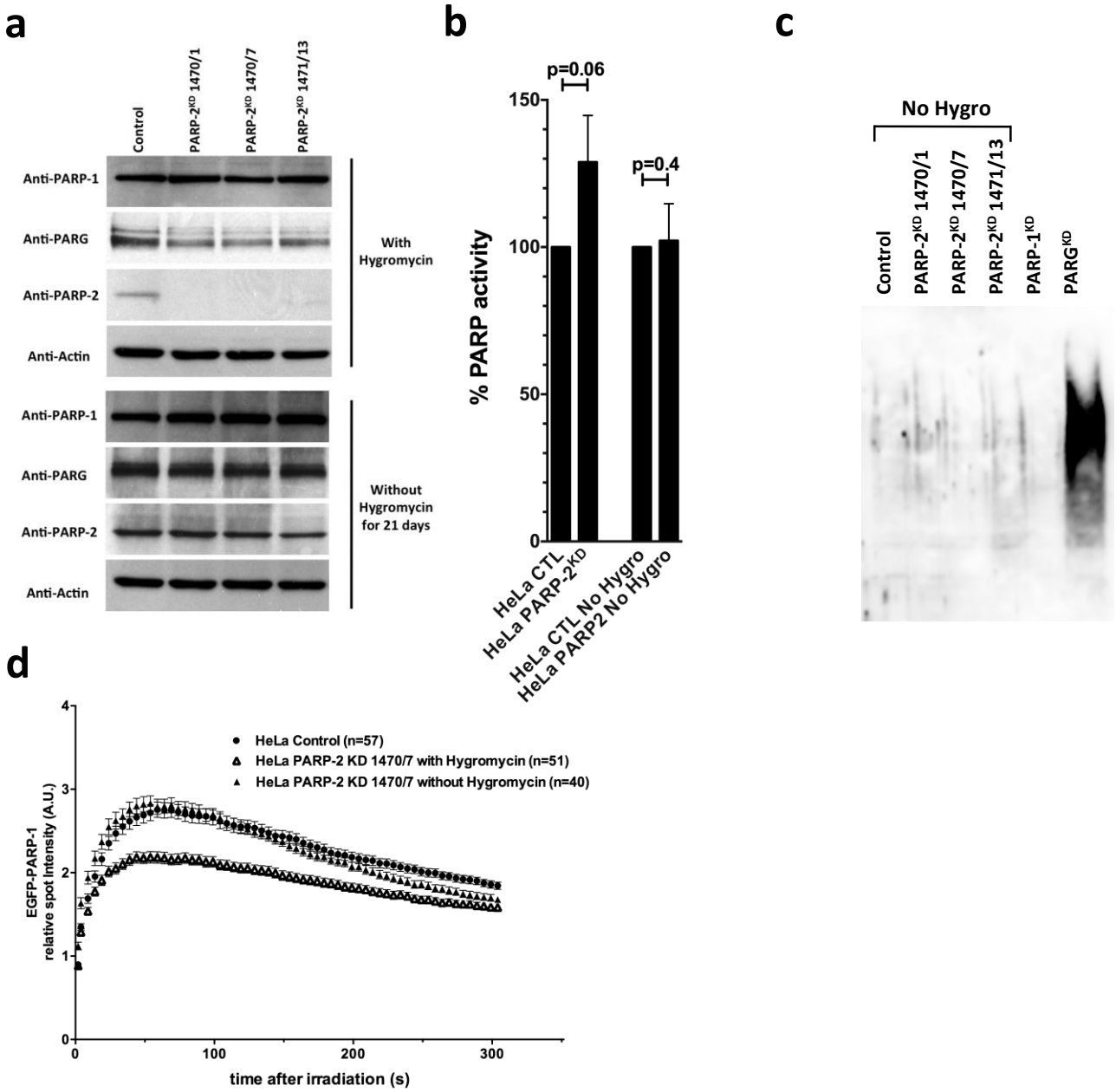
cells. J Biol Chem 284(49):33926–33938. doi:10.1074/jbc.M109.023879
30. Lan L, Nakajima S, Oohata Y, Takao M, Okano S, Masutani M, Wilson SH, Yasui A (2004) In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA 101(38):13738–13743
31. Mortusewicz O, Fouquerel E, Ame JC, Leonhardt H, Schreiber V (2011) PARG is recruited to DNA damage sites through poly(-ADP-ribose)- and PCNA-dependent mechanisms. Nucleic Acids Res 39(12):5045–5056
32. Bolin C, Boudra MT, Fernet M, Vaslin L, Pennaneach V, Zaremba T, Biard D, Cordelieres FP, Favaudon V, Megnin-Chanet F, Hall J (2011) The impact of cyclin-dependent kinase 5 depletion on poly(ADP-ribose) polymerase activity and responses to radiation. Cell Mol Life Sci 69:951–962
33. Slade D, Dunstan MS, Barkauskaite E, Weston R, Lafite P, Dixon N, Ahel M, Leys D, Ahel I (2011) The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Nature 477(7366):616–620. doi:10.1038/nature10404
34. Fu KK, Phillips TL, Heilbron DC, Ross G, Kane LJ (1979) Relative biological effectiveness of low- and high-LET radiotherapy beams for jejunal crypt cell survival at low doses per fraction. Radiology 132(1):205–209. doi:10.1148/132.1.205
35. Nikjoo H, Lindborg L (2010) RBE of low energy electrons and photons. Phys Med Biol 55(10):R65–R109. doi:10.1088/0031-9155/55/10/R01
36. Noel G, Giocanti N, Fernet M, Megnin-Chanet F, Favaudon V (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is not involved in DNA double-strand break recovery. BMC cell biol 4:7. doi:10.1186/1471-2121-4-7
37. Ohtsuki K, Ishida N (1975) Neocarzinostatin-induced breakdown of deoxyribonucleic acid in HeLa-S3 cells. J antibiot 28(2):143–148
38. Ziv Y, Bar-Shira A, Pecker I, Russell P, Jorgensen TJ, Tsarfati I, Shiloh Y (1997) Recombinant ATM protein complements the cellular A-T phenotype. Oncogene 15(2):159–167. doi:10.1038/sj.onc.1201319
39. Mohapatra S, Kawahara M, Khan IS, Yannone SM, Povirk LF (2011) Restoration of G1 chemo/radioresistance and double-strand-break repair proficiency by wild-type but not endonuclease-deficient Artemis. Nucleic Acids Res 39(15):6500–6510. doi:10.1093/nar/gkr257
40. Szanto M, Rutkai I, Hegedus C, Czikora A, Rozsahegyi M, Kiss B, Virag L, Gergely P, Toth A, Bai P (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction. Cardiovasc Res 92(3):430–438. doi:10.1093/cvr/cvr246
41. Ambrose HE, Willimott S, Beswick RW, Dantzer F, de Murcia JM, Yelamos J, Wagner SD (2009) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1)-deficient mice demonstrate abnormal antibody responses. Immunology 127(2):178–186. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02921.x
42. Yelamos J, Monreal Y, Saenz L, Aguado E, Schreiber V, Mota R, Fuente T, Minguela A, Parrilla P, de Murcia G, Almarza E, Aparicio P, Menissier-de Murcia J (2006) PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes. EMBO J 25(18):4350–4360. doi:10.1038/sj.emboj.7601301
43. Kutuzov MM, Khodyreva SN, Ame JC, Ilina ES, Sukhanova MV, Schreiber V, Lavrik OI (2013) Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. Biochimie 95(6):1208–1215. doi:10.1016/j.biochi.2013.01.007
44. Shirai H, Poetsch AR, Gunji A, Maeda D, Fujimori H, Fujihara H, Yoshida T, Ogino H, Masutani M (2013) PARG dysfunction enhances DNA double strand break formation in S-phase after alkylation DNA damage and augments different cell death pathways. Cell Death Dis 4:e656. doi:10.1038/cddis.2013.133
45. Uchiumi F, Watanabe T, Ohta R, Abe H, Tanuma S (2013) PARP1 gene expression is downregulated by knockdown of PARG gene. Oncol Rep 29(5):1683–1688. doi:10.3892/or.2013.2321
46. Huber A, Bai P, de Murcia JM, de Murcia G (2004) PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. DNA Repair 3(8–9):1103–1108

SUPPLEMENTARY FIGURE 1



Supplementary Fig. 1 Impact of PARP-2 depletion in HeLa cells on mRNA expression profiles and cell survival. The depletion of PARP-2 was associated with **(a)** a reduction in *parg* mRNA in the three HeLa PARP-2^{KD} clones. Data represents mean ± SD from at least three independent experiments. **(b)** Lower clonogenic survival was observed in HeLa PARP-2^{KD} cells compared to Control cells (Control cells—open symbols, PARP-2^{KD} cells—closed symbols) after exposure to increasing doses of γ-rays in S-phase (b-left panel) or neocarzinostatin in asynchronous cultures (b-right panel). Data represents mean ± SD from at least two independent experiments in triplicate. Data represents mean ± SD from one experiment in triplicate. In panels b, the solid lines represent the curves drawn for best fit of data to the linear-quadratic equation (see Materials and Methods). The dotted lines mark the upper and lower limits of the confidence interval drawn from the SDs calculated for the α and β parameters of the linear-quadratic model

SUPPLEMENTARY FIGURE 2



Supplementary Fig. 2 Restoring PARP-2 protein expression leads to restoration of PARG protein expression. The expression of PARP-1, PARG, and PARP-2 protein for HeLa PARP-2^{KD} depleted cells (clones 1,470/1, 1,470/7, and 1,471/13) and the Control cells grown in the presence on hygromycin B (a-upper panel) were compared the protein expression to the same clones grown for 21 days in the absence of hygromycin B (a-lower panel). Growth in the absence of hygromycin B resulted in a concomitant increase in the expression of the PARP-2 and PARG proteins **(a)**, a lowering of PARP activity to levels seen in Control cells as assessed by the incorporation of isotope from ^{32}P-NAD^{+} into trichloroacetic acid-precipitable proteins **(b)** and levels of polymers that were similar to that seen in Control cells as assessed by western blotting from untreated cell cultures (**c**). (**d**) Quantitative analysis of the relative spot intensity with time for the recruitment of EGFP-PARP-1 to sites of laser-induced damage in Control cells (closed circles), the PARP-2^{KD} clone 1,470/7 grown in the presence of hygromycin (open triangles) or the absence of hygromycin (closed triangles). Data represents mean relative spot intensity ± SEM, *n = 40–57* individual cells

SECONDE PARTIE :

PARP2 contrôle le choix des voies de la réparation des cassures double-brins de l'ADN en limitant le recrutement de 53BP1 et en stimulant la résection des extrémités

Introduction

Comme décrit dans l'introduction, la réparation des CDBs de l'ADN est primordiale dans le maintien de la stabilité du génome. Ces dommages peuvent provenir de sources endogènes associées à la réplication de l'ADN ou au métabolisme cellulaire, ou de sources exogènes comme l'exposition aux radiations ionisantes ou à certains agents de chimiothérapie. Quatre voies majeures de la réparation se partagent la prise en charge des extrémités pour assurer leur ligation, les voies du C-EJ et du Alt-EJ, de la RH et du SSA.

La voie du C-EJ dépend de la reconnaissance des extrémités par l'hétérodimère Ku qui sert de plateforme pour le recrutement des complexes de maturation et de ligation des extrémités de la cassure (Chiruvella et al., 2013). Cette voie de la réparation ne requière que peu de maturation des extrémités et est donc relativement conservative à ce titre (Guirouilh-Barbat et al., 2004). Cependant, la voie du C-EJ peut être à l'origine de multiples translocations qui est l'une des caractéristiques des cellules tumorales (Bhargava et al., 2017; Ghezraoui et al., 2014).

La voie de la RH est initiée par les protéines du complexe MRN en partenariat avec l'endonucléase CtIP, qui catalyse la résection des extrémités, permettant la formation d'un ADN-simple-brin 3'. Suite à l'extension de la résection par des nucléases et des hélicases, la protéine RPA qui stabilise l'ADN simple-brin est échangée par l'ATPase RAD51 par l'action de BRCA2. Le nucléofilament ainsi formé peut ensuite envahir la chromatide sœur au niveau d'une région d'homologie permettant la resynthèse de l'information génétique qui est suive de la finalisation de la réparation par la RH (Renkawitz et al., 2014). Cette voie est aussi largement conservative, mais peut toutefois produire de longues délétions ou des duplications en tandem au niveau des multiples séquences répétées présentes dans notre génome (Lehrman et al., 1985; Pentao et al., 1992; Yen et al., 1990).

L'initiation de la résection par le complexe MRN et CtIP peut aussi permettre de révéler des régions d'homologies qui peuvent servir à l'appariement des extrémités par les voies du Alt-EJ et du SSA (Ceccaldi et al., 2016). De par leur nature, ces voies de la réparation sont intrinsèquement délétères et produisent des délétions de tailles variables ainsi que des translocations (Elliott et al., 2005; Guirouilh-Barbat et al., 2007).

Un contrôle spatio-temporel strict de l'initiation de ces voies est donc essentiel car aucune d'entre-elles n'est parfaitement conservative dans tous les contextes. Ce contrôle est permis par l'action antagoniste des protéines 53BP1 et BRCA1 sur la prise en charge des extrémités. 53BP1 et ses partenaires RIF1, PTIP et MAD2L2 inhibent le recrutement de BRCA1 et la résection dépendante de CtIP en phase G1 du cycle cellulaire par un mécanisme non élucidé, favorisant ainsi la voie du C-EJ (Boersma et al., 2015a; Feng et al., 2013; Polato et al., 2014; Wang et al., 2014; Xu et al., 2015). A l'opposé, BRCA1 relocalise 53BP1 des sites de dommages via son activité E3 ubiquitine ligase en coopération avec son partenaire BARD1 (Densham et al., 2016), et RIF1 en collaboration avec l'E3 ubiquitine ligase UHRF1 (Zhang et al., 2016), permettant ainsi l'initiation des voies de la réparation qui dépendent de l'initiation de la résection. Le contrôle de l'initiation de la résection apparait donc essentiel dans le contrôle du choix des voies de la réparation ainsi que dans le maintien de la stabilité du génome.

PARP1 et PARP2 sont responsables de la quasi-totalité de la synthèse nucléaire des PAR (Ame et al., 1999). PARP1 et PARP2 ont un rôle équivalent dans la stimulation de la réparation des CSBs, dans la promotion de la RH aux fourches de réplication arrêtées et dans la protection de l'apparition de lymphomes T chez la souris (Bryant et al., 2009; Navarro et al., 2017; Schreiber et al., 2002). Cependant, alors que PARP1 est préférentiellement activé par les extrémités franches des cassures de l'ADN, PARP2 présente une affinité pour les « gaps » et les « flaps » qui sont des intermédiaires de réparation, suggérant un rôle distinct de ces deux protéines dans la réparation (Eustermann et al., 2011; Kutuzov et al., 2013a; Langelier et al., 2014b; Obaji et al., 2016; Sukhanova et al., 2016). Ces observations sont probablement expliquées de par l'absence de conservation des domaines de liaison à l'ADN de PARP1 et PARP2 (Ame et al., 1999). De plus, les cinétiques de recrutement de PARP1 et PARP2 au site de dommages à l'ADN induits par micro-irradiation laser diffèrent (Mortusewicz et al., 2007).

Lors de l'étude précédente présentée ci-dessus, nous avons observé que la déplétion de PARP2 dans la lignée HeLa diminue significativement la survie cellulaire en réponse aux CDBs de l'ADN induites par la néocarzinostatine, suggérant un rôle de PARP2 dans la réparation des CDBs (Boudra et al., 2015). Plusieurs évidences dans la littérature abondent dans ce sens.

- Tout d'abord, ce rôle pourrait être spécifique de PARP2 puisque l'absence de PARP1 ne sensibilise pas aux dommages induits par la néocarzinostatine (Bolin et al., 2012; Noel et al., 2003).
- Lors de la réparation des CDBs induites durant le CSR chez la souris, l'absence de PARP2 cause une augmentation de la fréquence des translocations IgH/c-myc d'un facteur 9, un facteur d'augmentation aussi important que lorsque la kinase ATM ou le suppresseur P53 sont inactivés (Ramiro et al., 2006; Robert et al., 2009). Ces translocations proviennent majoritairement de la voie de jonction des extrémités pouvant ainsi suggérer un rôle suppresseur de PARP2 dans ce contexte.
- La déplétion de PARP2 chez la souris produit aussi un stress réplicatif chronique, associé avec l'accumulation de CDBs en phase S du cycle cellulaire et la présence de micronoyaux dans les erythroblastes (Farres et al., 2015). Chez l'homme, PARP2 a été identifié dans un crible ayant pour objectif l'identification des protéines impliquées dans la réponse au stress réplicatif, pouvant suggérer un rôle commun de PARP2 (Kavanaugh et al., 2015).
- Au cours de la méiose, l'absence de PARP2 est associée avec une diminution d'un facteur 2 à 3 du nombre de chiasmas entre les chromatides sœurs, ce qui conduit à un mauvais alignement des chromatides et à des défauts de ségrégation chromosomique (Dantzer et al., 2006). Les chiasmas correspondant aux régions de recombinaison en chromatides sœurs, cette observation peut suggérer un rôle de PARP2 au sein de la RH.
- Finalement, l'expression de PARP2 est stimulée en réponse à la mitomycine C dans une lignée de cancer du col de l'utérus, la mitomycine C étant un agent génotoxique produisant des pontages de l'ADN (Kang et al., 2010). De même, l'expression de PARP2 est induite dans des xénogreffes de tumeurs hépatiques en réponse à un traitement par les radiations ionisantes ou la doxorubine (Lin et al., 2016).

Prises ensemble, toutes ces données suggèrent un rôle de PARP2 dans la réponse aux CDBs de l'ADN. Sur la base de ces données, nous avons donc décidé d'analyser pour la première fois le rôle de PARP2 dans la prise en charge des CDBs de l'ADN par la méganucléase I-Sce1. Lors de l'initiation du projet, nous avons développé une collaboration avec l'équipe de Bernard Lopez, afin d'utiliser des lignées cellulaires contenant des substrats permettant de mesurer l'efficacité de la réparation d'une CDB de l'ADN.

Le substrat de la réparation des CDBs par la voie de jonction des extrémités mesure l'efficacité des voies du C-EJ et du Alt-EJ (Guirouilh-Barbat et al., 2004 et figure 26). Ce substrat est présent au sein du génome d'une lignée de fibroblastes en une seule copie et permet de mesurer l'efficacité des voies du EJ après induction de deux CDBs induites par l'enzyme de restriction I-Sce1.

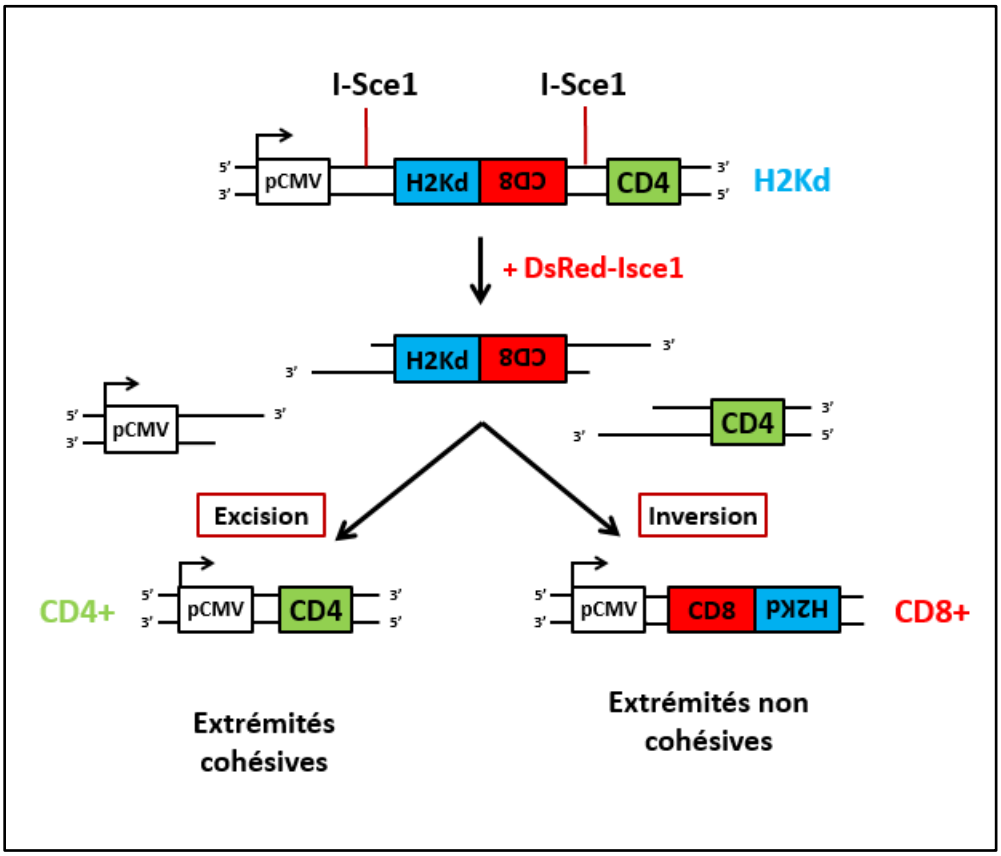


Figure 26 : Description du substrat d'analyse des voies de jonction des extrémités. Ce substrat contient trois cassettes d'expression (H2Kd, CD8 et CD4) dont seule H2Kd est exprimée car suffisamment proche du promoteur. Les cassettes H2Kd et CD8 sont entourées par deux sites de restriction pour l'enzyme I-Sce1, distant de 3.2 kb. L'expression de I-Sce1 produit deux CDBs de part et d'autre qui peuvent être réparées par jonction des extrémités. Si les cassettes H2Kd et CD8 sont excisées, alors CD4 sera exprimée et détectable par cytométrie en flux. Une inversion permet l'expression de CD8 qui est présente en orientation inverse. Dans ce contexte précis, les extrémités seront en revanche non cohésives.

La réparation des deux CDBs induites par I-Sce1 peut produire deux scénarios : un évènement d'excision rapproche la cassette CD4 du promoteur permettant sa détection par cytométrie en flux, alors qu'une inversion des cassettes H2Kd et CD8 permet l'expression du

marqueur CD8. Au cours de cette étude, nous nous sommes focalisés sur l'analyse de l'expression du marqueur CD4. De façon importante, la nature des jonctions post-réparation peut être déterminée par séquençage. L'équipe de Bernard Lopez a mis en évidence que la nature des jonctions permet de déterminer l'utilisation des voies du C-EJ ou du Alt-EJ. Ainsi, les délétions de 4 pb ou moins, correspondant à « l'overhang » produit par I-Sce1, sont dépendantes de Ku et de XRCC4 et correspondent à des évènements de réparation dépendants de la voie du C-EJ. A l'inverse, toutes les délétions au-delà de cet « overhang » correspondent à des évènements de la réparation dépendants de la voie du Alt-EJ (Guirouilh-Barbat et al., 2004; Guirouilh-Barbat et al., 2007). De façon importante, l'efficacité de réparation de ce substrat n'est pas dépendante de la position des cellules dans le cycle cellulaire (Guirouilh-Barbat et al., 2008).

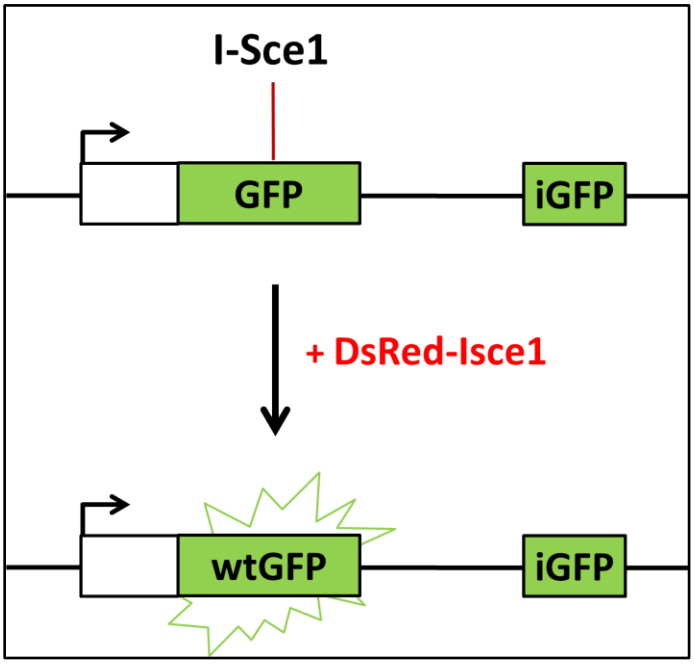


Figure 27 : Description du substrat DR-GFP. Deux GFP non codantes sont présentes dans ce substrat. La première contient un site I-Sce1 ainsi que deux codons STOP dans le cadre de lecture alors que la seconde est tronquée. Un évènement de recombinaison permet la reconstruction d'une GFP fonctionnelle détectable par immunofluorescence ou par cytométrie en flux.

Le substrat de la réparation par la RH, nommé DR-GFP, a été développé par l'équipe de Maria Jasin (Pierce et al., 1999 et figure 27). Ce substat contient deux GFP inactives, séparées de 3.7 kb. Après induction d'une CDB unique par I-Sce1, la seconde GFP qui est tronquée sert de

donneuse pour la conversion génique. Le produit de réparation de la RH permet ainsi de reconstituer une GFP fonctionnelle.

Finalement, le substrat SA-GFP, aussi développé au sein de l'équipe de Maria Jasin, permet de reconstruire une GFP fonctionnelle en rapprochant deux formes tronquées du gène codant pour la GFP par la voie du SSA, en utilisant 266 pb d'homologie (Stark et al., 2004a). Cette forme de réparation produit une délétion de 2.7 kb. Ce substrat peut aussi être réparé par la RH, mais une GFP fonctionnelle ne sera pas reconstruite dans ces conditions.

En utilisant 4 lignées cellulaires différentes contenant ces substrats, j'ai déterminé le rôle relatif de PARP1 et de PARP2 au sein de la réparation des CDBs de l'ADN.

Résultats

L'analyse des rôles respectifs de PARP1 et de PARP2 dans la réparation des CDBs de l'ADN a abouti à la rédaction d'un article de recherche qui est actuellement soumis dans Nucleic Acid Research Les principaux résultats de cet article sont présentés ci-dessous

- **La déplétion de PARP2 diminue l'efficacité des voies de réparation de la RH, du Alt-EJ et du SSA et augmente l'efficacité de la voie du C-EJ alors que l'absence de PARP1 n'affecte pas l'efficacité de réparation des CDBs.**

- **Le rôle de PARP2 dans la réparation des CDBs est indépendant de son activité enzymatique**

- **PARP2 stimule la résection des extrémités expliquant pourquoi son absence affecte l'efficacité des voies de la réparation qui dépendent de cette étape**

- **PARP2 limite l'accumulation de 53BP1 à la chromatine, une barrière de la résection**

- **En absence de 53BP1, la présence de PARP2 n'est plus requise pour la réparation des CDBs de l'ADN**

- **PARP2 coopère avec BRCA1 pour faciliter la réparation des CDBs par la RH, le SSA et le Alt-EJ.**

La compilation de ces données nous permet de proposer un modèle au cours duquel PARP2 limite l'accumulation de 53BP1, ce qui canalise la réparation des CDBs de l'ADN vers les voies de réparation dépendantes de la résection des extrémités (RH, SSA, Alt-EJ), au détriment de la voie du C-EJ.

PARP2 controls double-strand break repair pathway choice by limiting 53BP1 accumulation at DNA damage sites and promoting end-resection

Alexis Fouquin (1,2,3), Josée Guirouilh-Barbat (4), Bernard Lopez (4), Janet Hall (5), Mounira Amor-Guéret (1,2,3) and Vincent Pennaneach (1,2,3,6)

(1) Institut Curie, PSL Research University, UMR 3348, 91405 Orsay, France
(2) CNRS, UMR3348, Centre Universitaire, Bât. 110, 91405 Orsay, France
(3) Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, UMR 3348, 91405 Orsay, France
(4) Université Paris Sud, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, CNRS UMR8200, 94805 Villejuif, France. Team labeled by la Ligue contre le cancer "Ligue 2017"
(5) Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM, CNRS, UMR 1052-5286, 69424 Lyon, France
(6) To whom correspondence should be addressed; Email: [vincent.pennaneach@curie.fr]; Tel: [+33169863105]; Fax: [+33169075327]

Running title : PARP2 controls broken DNA end-resection

ABSTRACT

Double strand breaks (DSBs) are one of the most toxic lesions to cells. DSB repair by the canonical non-homologous end-joining (C-EJ) pathway involves minor, if any, processing of the broken DNA-ends, whereas the initiation of DNA resection channels the broken-ends towards DNA repair pathways using various lengths of homology. Mechanisms that control the resection initiation are thus central to the regulation to the choice of DSB repair pathway. Therefore, understanding the mechanisms which regulate the initiation of DNA end-resection is of prime importance. Our findings reveal that poly(ADP-ribose) polymerase 2 (PARP2) is involved in DSBR pathway choice independently of its catalytic activity. We show that PARP2 favors repair by homologous recombination (HR), single strand annealing (SSA) and alternative-end joining (A-EJ) rather than the C-EJ pathway and increases the deletion sizes at A-EJ junctions. We demonstrate that the PARP2 specifically limits the accumulation of the resection barrier factor 53BP1 at DNA damage sites, allowing efficient CtIP-dependent DNA end-resection. Collectively, we have identified a new PARP2 function which directs DSBs towards resection-dependent repair pathways.

INTRODUCTION

Deoxyribonucleotide acid (DNA) double strand breaks (DSBs) are one of the most toxic lesions to cells. If unrepaired or misrepaired, DSBs result in cell death or in genome instability, which could contribute to cancer development. Repair of DSBs by the canonical non-homologous end-joining (thereafter referred to as canonical end-joining or C-EJ) pathway involves minor, if any, processing of the broken DNA-ends and requires the Ku70/80 complex (Ku) and DNA-PKcs (1). Binding of DSBs by Ku (2,3) and by 53BP1 in complex with its partner RIF1 and PTIP which coordinate the action of Rev7 (4-11) all facilitate C-EJ by preventing DNA end-resection by nucleases.

In contrast, the initiation of DNA resection channels the broken ends towards homology or microhomology-mediated repair. This process is initiated by the MRE11-RAD50-NBS1 complex (MRN) together with CtIP, resulting in the formation of a 3'-single-stranded DNA (ssDNA) stretch (12-15). The DSBs can then be processed by homologous recombination (HR), single strand annealing (SSA), alternative-end joining (A-EJ) or microhomology-mediated template switching (MMTS) pathways (16-19).

When central key C-EJ proteins, such as Ku70/80 or ligase IV are not functional, the DSBs are channeled to the A-EJ pathway after relatively short stretches of broken end-resection (16,20,21). The A-EJ is completed by the sealing of the break with the possible use of DNA sequence microhomology requiring the activity of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), polymerase θ and DNA ligase I and III (22). In contrast extensive resection, catalyzed by the EXO1, DNA2 and BLM proteins (11,23-25), is required for channeling the repair towards HR (26,27). The RPA complex that protects the ssDNA stretch generated by resection is replaced by RAD51, forming a nucleofilament in preparation for the subsequent homology search and strand invasion steps of HR (28). When strand invasion cannot occur or fails, the annealing of two complementary sequences that present some homology, leads to repair by SSA (12,21,29).

The C-EJ and HR pathways are both essentially conservative, whereas the A-EJ, SSA and MMTS pathways will inexorably produce deletions and eventually insertions at the junction of the repaired DNA ends. Therefore, understanding the mechanisms which regulate DNA end-resection and control the appropriate channeling of broken DNA ends towards conservative or mutagenic repair, is of prime importance (1).

The synthesis of polymers of ADP-ribose (PAR) is catalyzed by members of the poly(ADP-ribose) polymerases (PARP) protein family of which the activities of PARP1, PARP2 and PARP3 increase in response to DNA strand breaks (30-32). The PARP catalytic inhibitors currently used in the clinic or under development target both PARP1 and PARP2 because of the remarkable conservation in the structure of their catalytic domain (33). This high degree of similarity could in part explain the functional redundancies between the two proteins, in spite of the large differences in respective levels of enzymatic activity (30). Indeed, PARP1 and PARP2 are equally important in suppressing genomic instability in response to DNA damage (34), facilitating the repair of single-strand breaks (SSBs) (35) and restarting stalled replication forks (36). They also play redundant functions in suppressing T-cell lymphoma (37). However, PARP1 is preferentially activated by DNA nicks and DSBs, whereas PARP2 is predominantly activated by DNA gaps, flaps and recombination intermediates (38-41). Based on these DNA binding specificities it might be expected that PARP1 and PARP2 play different roles in DSB repair.

PARP1 has been shown to be involved in the repair of DSB by the A-EJ pathway (42) and PARP3 promotes repair of DSB by the C-EJ pathway(31,43), however there is less direct evidence for an involvement of PARP2 in DSB repair (DSBR). For instance PARP2 expression is induced by mitomycin C in cervical cancer and by radiation and doxorubicin in hepatocarcinoma where it correlates with larger and more aggressive tumors (44,45). In addition, PARP2, but not PARP1 depletion, results in sensitivity to the DSB inducing agent neocarzinostatin (46) and PARP2 specifically protects against illegitimate IgH/c-myc recombination during class switch recombination in mice (47). Taken together these observations suggest that PARP2 may be involved in DSBR, and prompted us to investigate the potential role of PARP2 in DSB repair by HR, SSA and EJ in human cell lines.

We present results highlighting an unsuspected strategic role for PARP2 in orienting the choice of DSBR pathways. We found that PARP2 limits 53BP1 accumulation at the site of DSB, thus favoring CtIP-dependent DNA end-resection. PARP2, together with BRCA1, enhances HR, SSA and A-EJ dependent DSBR. Moreover, the PAR synthesis activity of PARP2 is not required for its function in the DSBR pathway choice.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs

The eGFP-PARP-2, GFP-53BP1 and DsRed-Isce1 expression plasmids were a kind gift from Dr. V. Schreiber (UMR7175CNRS, ESBS, Illkirch, France), Dr. A. Friedl (Angewandte Physik und Messtechnik LRT2, UniBW, Germany) and Dr. A. Carreira (UMR3348, Institut Curie, Orsay, France) respectively. The eGFP-C1-FLAG-Ku70, eGFP-C1-FLAG-Ku80, eGFP-C1-FLAG-XRCC4 were obtained from Addgene (references #46957, #46958 and #46959). The eGFP-PARP-2 E545A protein was obtained by mutation of the pe*GFP-PARP2* plasmid using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) and verified by sequencing. The eGFP-PARP2 was rendered resistant to the siRNA PARP2#1 by introduction of silent mutations at the following nucleotide (5'-CTGATTCA**AT**T**GC**T**G**GAAGATGAT-3').

Cell lines and transfection

The SV40-transformed human fibroblast (HF) cell line has been previously described (48). All cell lines were grown at 5% CO_2, 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with antibiotics and 10% FCS. All tissue culture reagents were from ThermoFisher Scientific. Bleomycin was obtained from the Institut Curie hospital, the PARP inhibitor Veliparib (also known as ABT-888) was purchased from ENZO Life Science. For protein depletion, cells were transfected with 20 nmol of the targeting siRNA with Interferin (Ozyme, France) according to the manufacturer's instructions. Gene-specific siRNAs for PARP2 (#1 5'-CUAUCUGAUUCAGCUAUUA-3', #2 5'-GGUUACCAGUCUCUUAAGA-3' and #3 5'-GACCAACACUAUAGAAACC-3'), for PARP-1 (#1 5'-GAAAGUGUGUUCAACUAAU-3' and #2 5'-GGGCAAGCACAGUGUCAAA-3'), for BRCA1 (5'-GGAACCUGUCUCCACAAAG-3'), for CtIP (5'-GCUAAAACAGGAACGAAUC-3'), XRCC4 (5'-AUAUGUUGGUGAACUGAGA-3'), for 53BP1 (5'-AGAACGAGGAGACGGUAAUAGUGGG-3'), for RIF1 (5'-AGACGGUGCUCUAUUGUUA-3'), for siluciferase (5'-CUACGCCGAGUACUUCGA-3') and negative control siRNA (SR-CL000-005) were obtained from Eurogentec. Plasmids were transfected with Jet-PEI (Ozyme, France) according to the manufacturer's recommendations.

Cell lysates, immunoblotting and immunofluorescence microscopy

Whole cell extracts were prepared by resuspending the cells in 50 mM Tris–HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 0.1% SDS, 1mM $MgCl_2$,10 mM β-Glycero phosphate and 1 mM sodium vanadate containing 50 U/ml of the DNase Benzonase (Merk Millipore) and protease inhibitors cocktail 1 (Sigma-Aldrich) and incubated at 4°C for 20 min. The solubilized proteins were separated from the cell debris by centrifugation, denatured in Laemmli loading buffer and separated on SDS-PAGE gels. The protein contents were analysed by western blotting using the Oddysey reagents and imaging system (LI-COR Biosciences) according to the manufacturer recommendations.

For protein immunofluorescence staining, cells were grown on glass coverslips. When cells were treated with bleomycin prior to immunostaining, the treatment at a final concentration of 25 µg/ml was performed for 2 hours in culture media. For recovery, the cells were washed with drug-free media and further incubated for the indicated time into drug-free media. The cells were washed in PBS then soluble proteins were pre-extracted for 5 min on ice in 20 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM Hepes pH 7, 1 mM EGTA, 0.5% Triton X-100 and fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature. Prior to performing the immunostaining, the cells were incubated for 10 minutes with 0.2% Triton X-100 in PBS and blocked for 30 min in BSA 5%. Primary antibody incubations were done overnight at 4°C. After three washes with 0.5% Triton X-100 in PBS, cells were incubated with appropriate Alexa-labeled secondary antibody (Molecular Probes) for 2 hours at room temperature. Cells were washed three times with 0.5% Triton X-100 in PBS and DNA was counter-stained with 0.1 ug/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in PBS before mounting in fluorescent mounting medium (DAKO). Images were taken using a large field Leica 3D microscope at the 63X objective (Leica microsystem). Antibodies used in this study were : anti-53BP1 (Abcam 21083), anti-RAD51 (Santa Cruz, H-92), anti-RIF1 (Santa Cruz, N-20), anti-γH2AX (Upstate, clone JBW301), anti-RPA32 (Abcam 2175), anti-Ku80 (Abcam 33242), anti-BRCA1 (Santa Cruz, D-9), anti-PARP-1 (Enzo, C2-10), anti-PARP-2 (Enzo, ALX-804-639), anti-XRCC4 (Abcam 145), anti-CtIP (Santa Cruz, T-16), anti-Actin (Thermo Fisher, Ab5), anti-CD4 (BD clone RM4-5).

Flow cytometry

Cell cycle analysis was performed by collecting the cells followed by an overnight fixation in 70% ethanol at -20°C. Cells were rehydrated in PBS containing 0.25% Triton X-100

for 15 min and incubated in PBS containing 25 µg/ml propidium iodide and 25 µg/ml RNase for 15 min at 37°C. For flow cytometry analysis at least 30,000 cells were acquired using a FACScalibur (BD Biosciences) and data were processed using the FlowJo software (FlowJo, LLC). Quantification of RPA accumulation at the chromatin according to the cells DNA content was performed as previously described (49).

Live-cell microscopy and laser micro-irradiation

Laser micro-irradiation experiments were essentially performed as described previously (46) with some modifications. Briefly, the cells were grown on plastic µ-Dish 35 mm (Ibidi) and transfected with the eGFP fusion protein expression plasmid 48 hours prior to imaging. The cells were presensitized by adding 10 µg/ml of Hoechst dye 33258 to the media. The recruitment and the real-time follow-up of the protein of interest was carried out using a Confocal Leica SP5 system equipped with a 37°C heating chamber attached to a DMI6000 stand using 63x/1.4 objective of the PICT-IBiSA Orsay Imaging facility of Institut Curie. DNA photodamage were locally induced using a 2-photon laser set to minimal power at 810 nm and focused onto a single spot of constant size (176 nm) within the nucleus to generate a point of photodamage. Recruitment of the protein of interest was followed for 10 min using a 488 nm argon laser line. The fluorescent protein enrichment at the photodamage site was extracted with the ImageJ software using an in house developed macro (46). Experiments were performed at least three times for each protein of interest.

DNA repair assay

The efficiency of I-Sce1 induced DNA DSB repair was monitored in previously described cell lines. The HF EJ-CD4 (clone GC92) was used to analyse end-Joining efficiency (11), the HF DR-GFP (clone RG37) line (50) and the human bone osteosarcoma epithelial cell line U2OS DR-GFP (51) were used to analyse HR efficiency and the U2OS-SSA line (19) was used to analyse SSA. DNA repair analysis is performed as follow, one day before transfection with siRNA, 1.5 x 10^5 cells were plated in 60 mm petri dish. After two days, the cells were then transfected with the pDsRed-ISce1 plasmid. Cells were collected after a further 48 hour incubation. The GFP positive cells for the DR-GFP and the SA-GFP cell lines were scored by flow cytometry (FACS calibur, BD Biosciences). For the E-J assay performed in the HF EJ-CD4 line, cells were fixed in 2%

paraformaldehyde for 15 min and blocked with 5% BSA in PBS for 30 min. Cells were incubated for 45 min with an 0.5ug of an anti-CD4 coupled to FITC in 5% BSA/PBS. The cells were washed in PBS before CD4 positive evens were scored by flow cytometry. The relative repair efficiency was determined by correcting the proportion of GFP or CD4 positive cells for the transfection efficiency deduced from the fraction of DsRed positive cells in each sample.

DNA sequence analysis of EJ events

Genomic DNA from HF EJ-CD4 was extracted from frozen cell pellets following DNA repair experiments and PCR amplified with Herculase II Polymerase (Agilent Technologie) using the primers CMV-5 "ATTATGCCCAGTACATGACCTTATG" and CD4int "GCTGCCCCAGAATCTTCCTCT" flanking the junction point. The PCR products were gel purified and cloned into the pCR II-Blunt-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific) and sequenced (GATC Biotech). Events are categorized in two classes according to the DNA sequence found at the repair junction. The events limited to the 3'Pnt are repair events for which the sequence at the repair junction includes at least one of the four nucleotides from the 3' Pnt generated by I-SceI cleavage. The events with deletion exceeding the 3'Pnt, are events for which the sequence at the repair junction have four or more of the nucleotides at the I-SceI cleavage site that have been deleted.

Colony formation assay

Cells were transfected with siRNAs, incubated for 48 hours and then trypsinised, counted. For bleomycin treatment, the cells in suspension were supplemented with media containing bleomycin at the indicated concentration and incubated for 1 hour at 37°C. Following drug dilution, cells were seeded at 1000 cells per well in 6-well culture plates in triplicate. The cells were fixed with ethanol 96% after 7 days, and stained with Coomassie blue R250 (0.05%). Colonies of more than 20 cells were counted. Irradiations were carried out at room temperature using low-energy Philipps MCN-323 X-ray generator (200-kVp, 0.3-mm copper and 1-mm aluminum additional filtration, 80-keV effective energy) operating at 21 mA with a dose rate of 1 Gy/min.

Statistical analysis

Unless stated otherwise, statistical analysis performed in the manuscript are standard two-tails t-test performed using the Graphpad PRISM software. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 and ns, not significant.

RESULTS

PARP2 depletion alters DSB repair efficiency

To investigate the role of PARP2 in the response to DSB, we constructed an SV40-transformed human normal fibroblast cell line (HF) stably expressing a short hairpin RNA (shRNA) to downregulate PARP2 (HF shPARP2) (46). The cells were irradiated with X-rays and treated with the radiomimetic drug bleomycin, both of which generating SSBs and DSBs (52). Compared to the control cell line (HF shcontrol), PARP2 depleted cells (HF shPARP2) were significantly more sensitive to both X-rays (Figure 1A) and bleomycin (Figure 1B). These results support a role for PARP2 in DSBs processing.

Next, we determined whether PARP2 could contribute directly to the repair of a single I-Sce1-induced DSB in intrachromosomal reporter substrates. We used three cellular models in which the I-Sce1-cut is a substrate for HR (HF DR-GFP and U2OS DR-GFP cell lines), or for C-EJ and A-EJ (HF EJ-CD4 cell line) (see Supplementary Figure S1A-B and Materials and Methods section for detailed cell lines' description) (11,50,51). We first investigated whether PARP2 could modulate the efficiency of HR. PARP2 silencing with three different siRNAs (Figure 1C and Supplementary Figure S1G) resulted in a significant decrease in HR relative efficiency in both HF DR-GFP (Figure 1D) and U2OS DR-GFP (Figure 1E) cell lines when compared to the control siRNA treated cell lines. We then evaluated the role of PARP2 in EJ repair. We observed that silencing of PARP2 in the HF EJ-CD4 cells, with each of the three siRNAs, resulted in a significant increase in EJ relative efficiency compared to the control siRNA treated cells (Figure 1F). In comparison, PARP1 silencing with two different siRNAs (Supplementary Figure S1F-G) did not alter neither HR relative efficiency in HF DR-GFP and U2OS DR-GFP cells, nor EJ relative efficiency in HF EJ-CD4 cells, compared to control siRNA treated cells (Supplementary Figure S1C-E). Given that siPARP2#1 had the greatest effect on EJ relative efficiency (Figure 1F), increased the relative frequency in γ-H2AX foci formation after

bleomycin (Supplementary Figure S1H) and that siPARP1#1 gave the strongest knockdown efficacy (Supplementary Figure S1F-G), without affecting the cell-cycle distribution (Supplementary Figure S1I), they were used for all subsequent experiments. Taken together, these results suggest a specific role for PARP2 for promoting HR and inhibiting EJ during DSBR.

PARP2 promotes HR and A-EJ, independently of its catalytic activity

In response to DNA damage, PARP1 produces approximately 85% of the overall cellular PARylation, whereas PARP-2 activity accounts for most of the residual nuclear PAR formation (30). To address whether the catalytic activity of PARP2 was necessary for DSBR regulation, we treated both HF DR-GFP and HF EJ-CD4 cell lines depleted of PARP1 with the PARP inhibitor Veliparib (also known as ABT-888). We found that treating the PARP1 depleted cells with Veliparib had no effect on HR (Figure 2A) and EJ (Figure 2B) relative efficiencies. In addition, we observed that the Veliparib treatment had no effect on the HR and EJ efficiencies in the siControl treated cells nor in the PARP2 depleted cells (Figure 2A-B). These results suggest that the role of PARP2 in modulating DSBR is independent of its catalytic activity and that PARP1 activity does not affect DSBR either in the presence or in the absence of PARP2.

To directly test this possibility, the HF EJ-CD4 cells were stably transfected with a construct expressing either the GFP fused full-length wild type PARP2 protein (GFP-PARP2) or the PARP2 catalytic dead E545A mutant protein (GFP-PARP2 E545A) (Supplementary Figures S2A-B). Both proteins could be readily recruited to the site of laser micro-irradiation induced DNA damage, as previously reported (Supplementary Figure S2C) (53). We found that PARP2 silencing by siRNA sensitized HF EJ-CD4 cells to bleomycin, and the reintroduction of either the siPARP2 resistant wild type PARP2 or PARP2 E545A mutant fully restored the survival efficiency of PARP2 depleted cells, to the level of control cells (Figure 2C), suggesting that PARP2 facilitates DSB repair independently of its enzymatic activity. In addition the reintroduction of the wild type form or the catalytic dead mutant of PARP2 fully restored the relative EJ efficiency in HF EJ-CD4 cells ($P = 0.0018$ and $P = 0.0016$, respectively). These results allowed us to rule out possible off-targets effect of the siRNAs and to confirm that PARP2 inhibits EJ and promotes cell survival upon DNA damage independently of its catalytic activity.

Interactions between PARP2 and the Ku heterodimer have been reported *in vivo* (54-56), thus we next examined if PARP2 could limit C-EJ efficiency by hindering the accumulation of the core EJ proteins at DNA damage sites. We observed that the kinetics of EGFP-Ku80, EGFP-Ku70 and EGFP-XRCC4 recruitment at sites of laser-induced DNA damage is not altered in PARP2-depleted HeLa cells (Supplementary Figures S3A-D). Also, PARP2 and XRCC4 depletion had independent effects on EJ efficiency (Supplementary Figures S3E-F). Thus, we can exclude the possibility that PARP2 is regulating core C-EJ factors.

To gain more insight into the mechanism behind PARP2's function during EJ, sequences at the EJ repair junctions in HF-EJ-CD4 cells were analyzed (Figure 2E and Supplementary Table S1). The EJ repair events were categorized into two classes according to the repair mechanism leading to the DNA sequence found at the repair junction (Supplementary Figure S1A and Supplementary Table S1). It was previously established that the repair of the I-Sce1 cleavage site by C-EJ was restricted to the four nucleotides of the 3'-protruding ends (3'-Pnt) generated by I-Sce1, whereas the repair of the I-Sce1 cleavage site by the non-conservative A-EJ involves deletions exceeding the four nucleotides of the 3'-Pnt (Supplementary Figure S1A and (20,57)). We found that the EJ repair events in the siControl or siPARP1 treated cells where evenly distributed between events involving 4 of the 3'-Pnt and deletions exceeding the 3'Pnt. This is consistent with PARP1's role in the repair by A-EJ, only in the absence of functional Ku (42,58,59). In contrast, the frequency of events including the 3'Pnt reached 64% in PARP2 depleted cells (Figure 2E), indicating that PARP2 is promoting A-EJ. In addition, the frequency of repair events with deletions of more than 20 nucleotides beyond the 3'Pnt was decreased by 38% in PARP2 depleted cells compared to that of the control cells ($P = 0.0335$, Figure 2F). The expression of wild type PARP2 or PARP2 E545A restored both A-EJ frequencies and the deletion sizes to levels similar to that of control cells (Figure 2E-F).

These findings reveal a new function of PARP2 in modulating DSBR pathway choice that is independent of its catalytic activity. The observations that PARP2 does not affect the recruitment of core C-EJ factors but promotes HR, A-EJ and contributes to an increase in the deletion sizes at A-EJ junctions suggest a role of PARP2 in promoting resection during the repair of broken DNA-ends.

PARP2 stimulates DNA end-resection

The initiating step of DNA end-resection is shared between HR and A-EJ repair pathways and limitation or inhibition of the resection favors the DSB repair by the C-EJ pathway (1). PARP2 depletion reduces HR and A-EJ relative efficiency and decreases the size of the deletion at A-EJ repair junctions and also increases the usage of C-EJ. From these observations we hypothesised that PARP2 depletion could impede DNA end-resection. Resection at broken DNA ends is essential for RAD51 filament formation on ssDNA to drive strand exchange with a homologous template during HR. We thus quantified the formation of RAD51 foci detected by immunofluorescence after bleomycin treatment in U2OS cells. We found a strong reduction in the RAD51 mobilization after bleomycin exposition in cells depleted for PARP2 ($P<0.0001$, Figures 3A-B). We also quantified by flow cytometry the accumulation of the single strand DNA binding complex RPA at the chromatin of bleomycin treated cells. We observed that the absence of PARP2 impedes the induction of the RPA signal at the chromatin after bleomycin treatment in U2OS cells ($P = 0.0047$, 6 h post bleomycin treatment, Figures 3C-D) and HeLa cells ($P = 0.0073$, Supplementary Figure S3G). PARP2 depletion also led to a strong reduction of the frequency of bleomycin-induced RPA foci detected by immunofluorescence in U2OS cells ($P = 0.001$, Supplementary Figure S3H). To directly assess the presence of single-stranded DNA in response to bleomycin exposure, we analysed BrdU signals by immunofluorescence without DNA denaturation. The depletion of PARP2 in U2OS cells significantly diminished the formation BrdU foci induced by bleomycin treatment (Figures 3E-F). The observations that PARP2-deficiency results in a significant reduction in the formation of Rad51 foci, RPA accumulation at the chromatin and BrdU foci formation after bleomycin treatment indicates that PARP2 favors broken DNA end-resection.

PARP2 stimulates DNA end-resection by preventing 53BP1 accumulation

The resection barrier established by 53BP1 and its effector RIF1 favor C-EJ and impedes the HR, SSA and A-EJ pathways (5,6,8-11). Based on our results we speculated that PARP2 might alleviate the end-resection barrier sustained by 53BP1. To test this we analysed 53BP1 foci assembly in response to bleomycin in U2OS cells. PARP2 depletion greatly increased the average number of bleomycin-induced 53BP1 foci in U2OS cells nuclei ($P < 0.0001$, Figures 4A-B). We next monitored the dynamics of GFP-53BP1 recruitment at sites of DNA damage induced by laser-microirradiation. We observed a significant higher enrichment of the GFP-53BP1

protein at laser-induced DNA damage sites in PARP2-depleted cells, as early as 2 minutes post-irradiation ($P < 0.001$, Figures 4C-D). These results demonstrate that PARP2 limits the 53BP1 accumulation at sites of DNA damage.

We next investigated the effect of 53BP1 silencing in PARP2-depleted cells on the repair efficiency of I-Sce1 cleaved sites. We found that the double depletion of 53BP1 and PARP2 (Figure 4I) suppresses the defect in HR (Figure 4E), SSA (Figure 4F) in the U2OS SA-GFP cells ((19) and Supplementary Figure S4A) and A-EJ (Figures 4G-H) of PARP2 depleted cells. In addition, the silencing of 53BP1 in the PARP2 depleted cells restores the C-EJ efficiency back to the levels seen in siRNA control cells (Figure 4H). Silencing of the 53BP1 co-factor, RIF1, also partially rescued HR and EJ efficiency defect in cells depleted for PARP2 (Supplementary Figures S4B-D).

Collectively, our data clearly indicate that PARP2 is contributing to the DSBR pathway choice by limiting 53BP1 accumulation at sites of DNA damage, thus allowing broken DNA-ends resection dependent repair pathways in disfavor of the C-EJ.

PARP2 co-operates with BRCA1 to stimulate CtIP-dependent end-resection

The resection step is initiated by the activity of the CtIP protein (60). The action of CtIP is antagonized by the end-resection barrier sustained by 53BP1 and its partners (61). We speculated that the PARP2 protein might control CtIP-dependent end-resection by limiting 53BP1 accumulation at broken-DNA ends. To investigate the relationship between PARP2 and CtIP proteins during DSBR, we down-regulated PARP2 and CtIP expression in HF DR-GFP, U2OS SA-GFP and HF EJ-CD4 cells. CtIP depletion (Figure 5A) led to a significant decrease in the relative efficiency of HR (Figure 5C), SSA (Figure 5D) and A-EJ (Figures 5E-F) pathways which all depend on the initiation of broken DNA-ends resection. Conversely, CtIP depletion (Figure 5A) significantly increased the relative EJ efficiency (Figures 5E-F). In addition, depleting PARP2 in the CtIP depleted cells did not affect the repair efficiency in CtIP depleted cells. These observations are in agreement with the well-established function of CtIP in initiating ssDNA formation at broken DNA-ends during homology-dependent repair (12,13,62), and indicate that the function of PARP2 in promoting end-resection is dependent on CtIP.

It has been described that BRCA1 alleviates the barrier sustained by the 53BP1 pathway, allowing CtIP-dependent DNA end-resection (63-65) and that the removal of 53BP1 in BRCA1

mutant cells is sufficient to allow CtIP-dependent DNA end-resection, which partially restores HR and SSA efficiency (5,8-10,61,66). Considering our data show that PARP2 is contributing to the DSBR pathways choice by limiting 53BP1 accumulation at sites of DNA damage, we investigated whether PARP2 and BRCA1 cooperate in promoting HR, SSA and A-EJ and in suppressing C-EJ. The silencing of BRCA1 (Figure 5B) reduced HR (Figure 5C), SSA (Figure 5D) and A-EJ (Figure 5F) efficiency, this is similar to the effect of CtIP or PARP2 depletion on these repair pathways. The depletion of PARP2 in BRCA1 depleted cells (Figure 5B) did not further reduce HR (Figure 5C), SSA (Figure 5D) and A-EJ (Figure 5F) efficiency, indicating that both proteins function together for the repair of I-Sce1 induced-cut by these resection-dependent pathways.

BRCA1 not only promotes end-resection dependent DSBR, it is also required for the efficient repair of I-Sce1 induced-cut by EJ (67-70). We confirmed that BRCA1 depletion significantly reduces the EJ efficiency (Figure 5E). In addition, the EJ efficiency in cells depleted of PARP2 or 53BP1 is further decreased when BRCA1 is also depleted in these cells (Figure 5E and Supplementary Figure S5), suggesting that BRCA1 is promoting both A-EJ and C-EJ. These results indicate that the role for BRCA1 in promoting C-EJ is distinct from the role of PARP2 which suppresses C-EJ by limiting 53BP1 accumulation at DNA damage sites (Figure 4). Our observations are in agreement with the previously identified role for BRCA1 in promoting C-EJ independently of 53BP1 (68).

To further characterize the genetic interactions between PARP2 and BRCA1 during DNA repair, we analysed the importance of these proteins in promoting cell viability in response to bleomycin. The depletion of either PARP2 or BRCA1 increased HeLa cells sensitivity to bleomycin, whereas the relatively high sensitivity of BRCA1-depleted HeLa cells to bleomycin did not further increase when PARP2 was depleted (Figures 5G-H). Taken together, these observations indicate that PARP2 and BRCA1 contribute together to DSBR by the HR, SSA and A-EJ pathway, and also confirm that the role for BRCA1 in C-EJ is independent of 53BP1.

DISCUSSION

In this study, we describe a new function for the PARP2 protein in controlling DSBR pathway choice. Indeed, we show that PARP2 prevents the accumulation of 53BP1 at damaged chromatin and allows CtIP-dependent broken DNA end-resection. Therefore, we propose a model

in which PARP2 is limiting the accumulation of the resection barrier imposed by 53BP1 at broken DNA ends, which in turn together with BRCA1 favors the channels DSB repair towards resection dependent repair pathways (HR, SSA and A-EJ) rather than C-EJ (Figure 6).

We also reported that C-EJ inhibition and HR promotion by PARP2 were independent on its PARylation activity. The previously known PARP2 functions in DNA repair were all associated with its catalytic activity, such as preventing illegitimate IgH/c-myc translocations during class switch recombination (CSR) in mice (47), or promoting the restart of stalled replication forks by HR (36). The PARP2 function we report here, that does not require PARylation activity, is clearly new and distinct from the previously known PARP2 functions in DSBR.

Our observations that neither PARP1, nor PARP's catalytic activity, regulate DSBR efficiency is consistent with PARP1's role in the choice of A-EJ only in the absence of functional Ku (42,58,59). Nonetheless, it does not preclude a potential role of PARP1 and its catalytic activity for DSBR in a more complex chromatin context. Indeed, PARP1 is important for the recruitment of several chromatin remodelers, which in turn stimulate the recruitment of DNA repair factors at the damaged chromatin (71-73).

53BP1 is acting as a barrier to resection of the broken DNA ends, blocking CtIP/MRN-dependent ends processing (18,74). However, the end-resection defect or the genomic instability in a CtIP deficient context is not reverted by 53BP1 loss, showing that the displacement of 53BP1 and its partners is required for CtIP-dependent end-resection (61). Likewise, our results highlight that the functions of PARP2 in stimulating HR, SSA and A-EJ are dependent on the expression of CtIP, showing that PARP2 and CtIP present an epistatic interaction in promoting these pathways, which in turn repress C-EJ. In addition, considering that both the increase in the relative C-EJ efficiency and the decrease in HR observed when PARP2 is absent are fully reverted when the resection barrier imposed by 53BP1 is removed, further suggests that PARP2 does not directly stimulate the catalytic reaction of end-resection. Instead, we propose that PARP2 limits the accumulation of the 53BP1 at broken DNA ends in favor of CtIP/MRN-dependent end-resection, thereby placing PARP2 upstream of CtIP/MRN DNA end-processing functions.

How PARP2 is regulating the recruitment of 53BP1 remains to be fully understood. 53BP1's initial recruitment at DNA damage sites is dependent of the dual recognition by its tudor domains and the UDR motif of the H2AK15ub and of the H4K20me2 histone marks respectively (75,76). One study has proposed that the PARP2 protein can function as a transcriptional co-repressor by recruiting histone deacetylases and a histone methyltransferase to locally generate repressive chromatin at targeted promotors (77). In addition, PARP2 was recently found in a complex containing the E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1 and RIF1, a 53BP1 partner reported to regulate DNA damage repair choice (78). Hence, we speculate that the recruitment of PARP2 at DNA damage sites through its capacity to recognize multiple DNA damage structures, and this independently of its catalytic activity, could bring together enzymes that regulate protein-protein interactions at DSB sites to promote accurate lesion repair.

We also found that the protective function of PARP2 against the genotoxic effect of bleomycin, a radiomimetic drug that directly induces DSBs and SSBs (with a 6 to 1 ratio) (52), depends on PARP2 protein expression not its' enzymatic activity. In S-phase, the progression of replication fork through unrepaired SSBs can also result in DSB. The requirement of PARP2 for the efficient formation of ssDNA, and the formation of HR foci in response to bleomycin, are consistent with the role for the PARP2 protein in regulating the accumulation of 53BP1 at broken DNA ends. However, PARP2 depletion did not further sensitize BRCA1 deficient cells to bleomycin despite its role in SSB resolution (35), suggesting that PARP2, in cooperation with BRCA1, promotes cells survival.

Several studies have shown that BRCA1 is involved in the regulation of end-resection initiation by displacing 53BP1 and its partners from DSBs (63-65). Our results suggest that PARP2 and BRCA1 play similar roles in alleviating 53BP1-dependent barrier, thus facilitating the CtIP-dependent DNA end-resection essential for HR and SSA to proceed.

In addition, we confirmed that BRCA1 and 53BP1 have distinct functions in stimulating EJ (this work and (68)). The observation that the absence of both BRCA1 and PARP2 restores EJ relative efficiency mostly through C-EJ, indicate that BRCA1 and PARP2 are not redundant during C-EJ. We speculate that the multiple functions of BRCA1 include the removal of the Ku complex (68-70) as well as promoting the limited end resection activities required for BRCA1 to support both C-EJ and A-EJ (67).

In conclusion, our findings identify a new crucial role for the PARP2 protein in regulating DSBR pathway choice, independently of its PARylation activity. PARP2 is limiting 53BP1 accumulation onto broken DNA, facilitating the CtIP-dependent DNA end-resection and thereby limiting the repair of double strand breaks by C-EJ. Moreover, our study reveals an independent function of BRCA1 in EJ that is yet to be elucidated. Further studies to decipher the catalytic activity-dependent and -independent functions of PARP2 during DSBR will be of prime importance in the context where small molecule inhibiting PAR synthesis appear likely to become a fundamental component in the management of patients with BRCA mutation associated tumors.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figures S1-S5 and Supplementary Table S1 are available online.

FUNDING

The authors greatly acknowledge the PICT-IBiSA@Orsay Imaging Facility of the Institut Curie supported by the French National Research Agency through the “Investissment for the future” program (France-BioImaging, ANR-10-INSB-04). Research was supported by funding from “Fondation-EDF” grants (RB2013-18 and RB2014-09 to VP) and by continuous financial support from INSERM (VP is an INSERM research scientist in UMR3348), CNRS and the Institut Curie. The Ministry of Education and the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer” are acknowledged for a PhD grant (AF).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest

AUTHORS CONTRIBUTION

The authors have made the following declarations about their contributions; Conceived and designed the experiments: VP AF. Performed the experiments: AF VP. Analyzed the data: AF VP. Contributed reagents/materials/analysis tools: JGB BL JH MAG. Wrote the paper: AF VP JGB BL JH MAG.

AKNOWLEDGEMENTS

We thank Marie-Noëlle Soler for the measurements of the Power output of bi-photon laser for induced photodamage.

REFERENCES

1. Ceccaldi, R., Rondinelli, B. and D'Andrea, A.D. (2016) Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in cell biology*, **26**, 52-64.
2. Sun, J., Lee, K.J., Davis, A.J. and Chen, D.J. (2012) Human Ku70/80 protein blocks exonuclease 1-mediated DNA resection in the presence of human Mre11 or Mre11/Rad50 protein complex. *J Biol Chem*, **287**, 4936-4945.
3. Shim, E.Y., Chung, W.H., Nicolette, M.L., Zhang, Y., Davis, M., Zhu, Z., Paull, T.T., Ira, G. and Lee, S.E. (2010) Saccharomyces cerevisiae Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. *EMBO J*, **29**, 3370-3380.
4. Boersma, V., Moatti, N., Segura-Bayona, S., Peuscher, M.H., van der Torre, J., Wevers, B.A., Orthwein, A., Durocher, D. and Jacobs, J.J. (2015) MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection. *Nature*, **521**, 537-540.
5. Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T., Tkac, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D. *et al.* (2013) A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell*, **49**, 872-883.
6. Feng, L., Fong, K.W., Wang, J., Wang, W. and Chen, J. (2013) RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. *J Biol Chem*, **288**, 11135-11143.
7. Wang, J., Aroumougame, A., Lobrich, M., Li, Y., Chen, D., Chen, J. and Gong, Z. (2014) PTIP associates with Artemis to dictate DNA repair pathway choice. *Genes & Development*, **28**, 2693-2698.
8. Zimmermann, M., Lottersberger, F., Buonomo, S.B., Sfeir, A. and de Lange, T. (2013) 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. *Science*, **339**, 700-704.
9. Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.-B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, Alessandro A., Adams, Ian R., Batista, Facundo D. and Boulton, Simon J. (2013) RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Molecular Cell*, **49**, 858-871.
10. Bunting, S.F., Callén, E., Wong, N., Chen, H.-T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L. *et al.* (2010) 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks. *Cell*, **141**, 243-254.
11. Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J., Barascu, A., Pennarun, G., Genet, D., Rass, E., Germann, S.M., Bertrand, P., Hickson, I.D. and Lopez, B.S. (2013) A role for BLM in double-strand break repair pathway choice: prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. *Cell reports*, **5**, 21-28.
12. Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N. and Stark, J.M. (2008) Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS genetics*, **4**, e1000110.

13. Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2009) Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 819-824.
14. Xie, A., Kwok, A. and Scully, R. (2009) Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 814-818.
15. Deriano, L., Stracker, T.H., Baker, A., Petrini, J.H. and Roth, D.B. (2009) Roles for NBS1 in alternative nonhomologous end-joining of V(D)J recombination intermediates. *Mol Cell*, **34**, 13-25.
16. Wang, H., Perrault, A.R., Takeda, Y., Qin, W., Wang, H. and Iliakis, G. (2003) Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5377-5388.
17. Kabotyanski, E.B., Gomelsky, L., Han, J.O., Stamato, T.D. and Roth, D.B. (1998) Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res*, **26**, 5333-5342.
18. Guirouilh-Barbat, J., Gelot, C., Xie, A., Dardillac, E., Scully, R. and Lopez, B.S. (2016) 53BP1 Protects against CtIP-Dependent Capture of Ectopic Chromosomal Sequences at the Junction of Distant Double-Strand Breaks. *PLoS genetics*, **12**, e1006230.
19. Stark, J.M., Pierce, A.J., Oh, J., Pastink, A. and Jasin, M. (2004) Genetic Steps of Mammalian Homologous Repair with Distinct Mutagenic Consequences. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 9305-9316.
20. Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2007) Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20902-20907.
21. Kabotyanski, E.B., Gomelsky, L., Han, J.-O., Roth, D.B. and Stamato, T.D. (1998) Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Research*, **26**, 5333-5342.
22. Chiruvella, K.K., Liang, Z. and Wilson, T.E. (2013) Repair of Double-Strand Breaks by End Joining. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**.
23. Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P. and Kowalczykowski, S.C. (2011) BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev*, **25**, 350-362.
24. Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C. and Jackson, S.P. (2008) DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev*, **22**, 2767-2772.
25. Karanja, K.K., Cox, S.W., Duxin, J.P., Stewart, S.A. and Campbell, J.L. (2012) DNA2 and EXO1 in replication-coupled, homology-directed repair and in the interplay between HDR and the FA/BRCA network. *Cell Cycle*, **11**, 3983-3996.
26. Fukushima, T., Takata, M., Morrison, C., Araki, R., Fujimori, A., Abe, M., Tatsumi, K., Jasin, M., Dhar, P.K., Sonoda, E. *et al.* (2001) Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. *J Biol Chem*, **276**, 44413-44418.
27. Pierce, A.J., Hu, P., Han, M., Ellis, N. and Jasin, M. (2001) Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev*, **15**, 3237-3242.
28. Li, X. and Heyer, W.-D. (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*, **18**, 99-113.

29. Mansour, W.Y., Schumacher, S., Rosskopf, R., Rhein, T., Schmidt-Petersen, F., Gatzemeier, F., Haag, F., Borgmann, K., Willers, H. and Dahm-Daphi, J. (2008) Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, **36**, 4088-4098.
30. Ame, J.C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Hoger, T., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G. (1999) PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem*, **274**, 17860-17868.
31. Rulten, S.L., Fisher, A.E., Robert, I., Zuma, M.C., Rouleau, M., Ju, L., Poirier, G., Reina-San-Martin, B. and Caldecott, K.W. (2011) PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Mol Cell*, **41**, 33-45.
32. Boehler, C., Gauthier, L.R., Mortusewicz, O., Biard, D.S., Saliou, J.-M., Bresson, A., Sanglier-Cianferani, S., Smith, S., Schreiber, V., Boussin, F. *et al.* (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 2783-2788.
33. Wahlberg, E., Karlberg, T., Kouznetsova, E., Markova, N., Macchiarulo, A., Thorsell, A.G., Pol, E., Frostell, A., Ekblad, T., Oncu, D. *et al.* (2012) Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors. *Nature biotechnology*, **30**, 283-288.
34. Menissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Ame, J.C., Dierich, A., LeMeur, M. *et al.* (2003) Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J*, **22**, 2255-2263.
35. Schreiber, V., Ame, J.C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem*, **277**, 23028-23036.
36. Bryant, H.E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A.S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P. and Helleday, T. (2009) PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J*, **28**, 2601-2615.
37. Navarro, J., Gozalbo-Lopez, B., Mendez, A.C., Dantzer, F., Schreiber, V., Martinez, C., Arana, D.M., Farres, J., Revilla-Nuin, B., Bueno, M.F. *et al.* (2017) PARP-1/PARP-2 double deficiency in mouse T cells results in faulty immune responses and T lymphomas. *Sci Rep*, **7**, 41962.
38. Langelier, M.F., Riccio, A.A. and Pascal, J.M. (2014) PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Res*, **42**, 7762-7775.
39. Obaji, E., Haikarainen, T. and Lehtio, L. (2016) Characterization of the DNA dependent activation of human ARTD2/PARP2. *Sci Rep*, **6**, 34487.
40. Sukhanova, M.V., Abrakhi, S., Joshi, V., Pastre, D., Kutuzov, M.M., Anarbaev, R.O., Curmi, P.A., Hamon, L. and Lavrik, O.I. (2016) Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosyl)ation using high-resolution AFM imaging. *Nucleic Acids Res*, **44**, e60.
41. Kutuzov, M.M., Khodyreva, S.N., Ame, J.C., Ilina, E.S., Sukhanova, M.V., Schreiber, V. and Lavrik, O.I. (2013) Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA

repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. *Biochimie*, **95**, 1208-1215.
42. Audebert, M., Salles, B. and Calsou, P. (2004) Involvement of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 and XRCC1/DNA Ligase III in an Alternative Route for DNA Double-strand Breaks Rejoining. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 55117-55126.
43. Beck, C., Boehler, C., Guirouilh Barbat, J., Bonnet, M.E., Illuzzi, G., Ronde, P., Gauthier, L.R., Magroun, N., Rajendran, A., Lopez, B.S. *et al.* (2014) PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. *Nucleic Acids Res*, **42**, 5616-5632.
44. Lin, L., Zhang, Y.D., Chen, Z.Y., Chen, Y. and Ren, C.P. (2016) The clinicopathological significance of miR-149 and PARP-2 in hepatocellular carcinoma and their roles in chemo/radiotherapy. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, **37**, 12339-12346.
45. Kang, Y.H., Lee, K.A., Kim, J.H., Park, S.G. and Yoon, D.Y. (2010) Mitomycin C modulates DNA-double strand break repair genes in cervical carcinoma cells. *Amino acids*, **39**, 1291-1298.
46. Boudra, M.T., Bolin, C., Chiker, S., Fouquin, A., Zaremba, T., Vaslin, L., Biard, D., Cordelieres, F.P., Megnin-Chanet, F., Favaudon, V. *et al.* (2015) PARP-2 depletion results in lower radiation cell survival but cell line-specific differences in poly(ADP-ribose) levels. *Cell Mol Life Sci*, **72**, 1585-1597.
47. Robert, I., Dantzer, F. and Reina-San-Martin, B. (2009) Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med*, **206**, 1047-1056.
48. Le Chalony, C., Hoffschir, F., Gauthier, L.R., Gross, J., Biard, D.S., Boussin, F.D. and Pennaneach, V. (2012) Partial complementation of a DNA ligase I deficiency by DNA ligase III and its impact on cell survival and telomere stability in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*, **69**, 2933-2949.
49. Forment, J.V., Walker, R.V. and Jackson, S.P. (2012) A high-throughput, flow cytometry-based method to quantify DNA-end resection in mammalian cells. *Cytometry A*, **81**, 922-928.
50. Wilhelm, T., Ragu, S., Magdalou, I., Machon, C., Dardillac, E., Techer, H., Guitton, J., Debatisse, M. and Lopez, B.S. (2016) Slow Replication Fork Velocity of Homologous Recombination-Defective Cells Results from Endogenous Oxidative Stress. *PLoS genetics*, **12**, e1006007.
51. Pierce, A.J., Johnson, R.D., Thompson, L.H. and Jasin, M. (1999) XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev*, **13**, 2633-2638.
52. Chen, J., Ghorai, M.K., Kenney, G. and Stubbe, J. (2008) Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res*, **36**, 3781-3790.
53. Riccio, A.A., Cingolani, G. and Pascal, J.M. (2016) PARP-2 domain requirements for DNA damage-dependent activation and localization to sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res*, **44**, 1691-1702.
54. Gibson, B.A., Zhang, Y., Jiang, H., Hussey, K.M., Shrimp, J.H., Lin, H., Schwede, F., Yu, Y. and Kraus, W.L. (2016) Chemical genetic discovery of PARP targets reveals a role for PARP-1 in transcription elongation. *Science*, **353**, 45-50.

55. Carter-O'Connell, I. and Cohen, M.S. (2015) Identifying Direct Protein Targets of Poly-ADP-Ribose Polymerases (PARPs) Using Engineered PARP Variants-Orthogonal Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD+) Analog Pairs. *Curr Protoc Chem Biol*, **7**, 121-139.
56. Isabelle, M., Moreel, X., Gagne, J.P., Rouleau, M., Ethier, C., Gagne, P., Hendzel, M.J. and Poirier, G.G. (2010) Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry. *Proteome Sci*, **8**, 22.
57. Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L. and Lopez, B.S. (2004) Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol Cell*, **14**, 611-623.
58. Yang, Y.G., Cortes, U., Patnaik, S., Jasin, M. and Wang, Z.Q. (2004) Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. *Oncogene*, **23**, 3872-3882.
59. Mansour, W.Y., Borgmann, K., Petersen, C., Dikomey, E. and Dahm-Daphi, J. (2013) The absence of Ku but not defects in classical non-homologous end-joining is required to trigger PARP1-dependent end-joining. *DNA Repair (Amst)*, **12**, 1134-1142.
60. Cruz-Garcia, A., Lopez-Saavedra, A. and Huertas, P. (2014) BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. *Cell reports*, **9**, 451-459.
61. Polato, F., Callen, E., Wong, N., Faryabi, R., Bunting, S., Chen, H.T., Kozak, M., Kruhlak, M.J., Reczek, C.R., Lee, W.H. *et al.* (2014) CtIP-mediated resection is essential for viability and can operate independently of BRCA1. *J Exp Med*, **211**, 1027-1036.
62. Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J. and Jackson, S.P. (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, **450**, 509-514.
63. Isono, M., Niimi, A., Oike, T., Hagiwara, Y., Sato, H., Sekine, R., Yoshida, Y., Isobe, S.Y., Obuse, C., Nishi, R. *et al.* (2017) BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell reports*, **18**, 520-532.
64. Densham, R.M., Garvin, A.J., Stone, H.R., Strachan, J., Baldock, R.A., Daza-Martin, M., Fletcher, A., Blair-Reid, S., Beesley, J., Johal, B. *et al.* (2016) Human BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase activity counteracts chromatin barriers to DNA resection. *Nat Struct Mol Biol*, **23**, 647-655.
65. Alagoz, M., Katsuki, Y., Ogiwara, H., Ogi, T., Shibata, A., Kakarougkas, A. and Jeggo, P. (2015) SETDB1, HP1 and SUV39 promote repositioning of 53BP1 to extend resection during homologous recombination in G2 cells. *Nucleic Acids Research*, **43**, 7931-7944.
66. Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q. *et al.* (2010) 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 688-695.
67. Biehs, R., Steinlage, M., Barton, O., Juhasz, S., Kunzel, J., Spies, J., Shibata, A., Jeggo, P.A. and Lobrich, M. (2017) DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. *Mol Cell*, **65**, 671-684 e675.
68. Hu, Y., Wang, C., Huang, K., Xia, F., Parvin, J.D. and Mondal, N. (2014) Regulation of 53BP1 Protein Stability by RNF8 and RNF168 Is Important for Efficient DNA Double-Strand Break Repair. *PLOS ONE*, **9**, e110522.
69. Jiang, G., Plo, I., Wang, T., Rahman, M., Cho, J.H., Yang, E., Lopez, B.S. and Xia, F. (2013) BRCA1-Ku80 Protein Interaction Enhances End-joining Fidelity of Chromosomal

Double-strand Breaks in the G1 Phase of the Cell Cycle. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 8966-8976.

70. Zhong, Q., Chen, C.F., Chen, P.L. and Lee, W.H. (2002) BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, **277**, 28641-28647.
71. Luijsterburg, M.S., de Krijger, I., Wiegant, W.W., Shah, R.G., Smeenk, G., de Groot, A.J., Pines, A., Vertegaal, A.C., Jacobs, J.J., Shah, G.M. *et al.* (2016) PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining. *Mol Cell*, **61**, 547-562.
72. Polo, S.E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y. and Jackson, S.P. (2010) Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *The EMBO Journal*, **29**, 3130.
73. Ahel, D., Horejsi, Z., Wiechens, N., Polo, S.E., Garcia-Wilson, E., Ahel, I., Flynn, H., Skehel, M., West, S.C., Jackson, S.P. *et al.* (2009) Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science*, **325**, 1240-1243.
74. Bothmer, A., Robbiani, D.F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M.C. (2010) 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *J Exp Med*, **207**, 855-865.
75. Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.-E., Thompson, J.R., Chen, J. and Mer, G. (2006) Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell*, **127**, 1361-1373.
76. Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C., Huang, H., Landry, M.-C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M. and Sicheri, F. (2013) 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature*, **499**, 50-54.
77. Liang, Y.C., Hsu, C.Y., Yao, Y.L. and Yang, W.M. (2013) PARP-2 regulates cell cycle-related genes through histone deacetylation and methylation independently of poly(ADP-ribosyl)ation. *Biochemical and biophysical research communications*, **431**, 58-64.
78. Zhang, H., Liu, H., Chen, Y., Yang, X., Wang, P., Liu, T., Deng, M., Qin, B., Correia, C., Lee, S. *et al.* (2016) A cell cycle-dependent BRCA1–UHRF1 cascade regulates DNA double-strand break repair pathway choice. *Nature Communications*, **7**, 10201.

Figure 1 : PARP2 depletion alters DSB repair efficiency

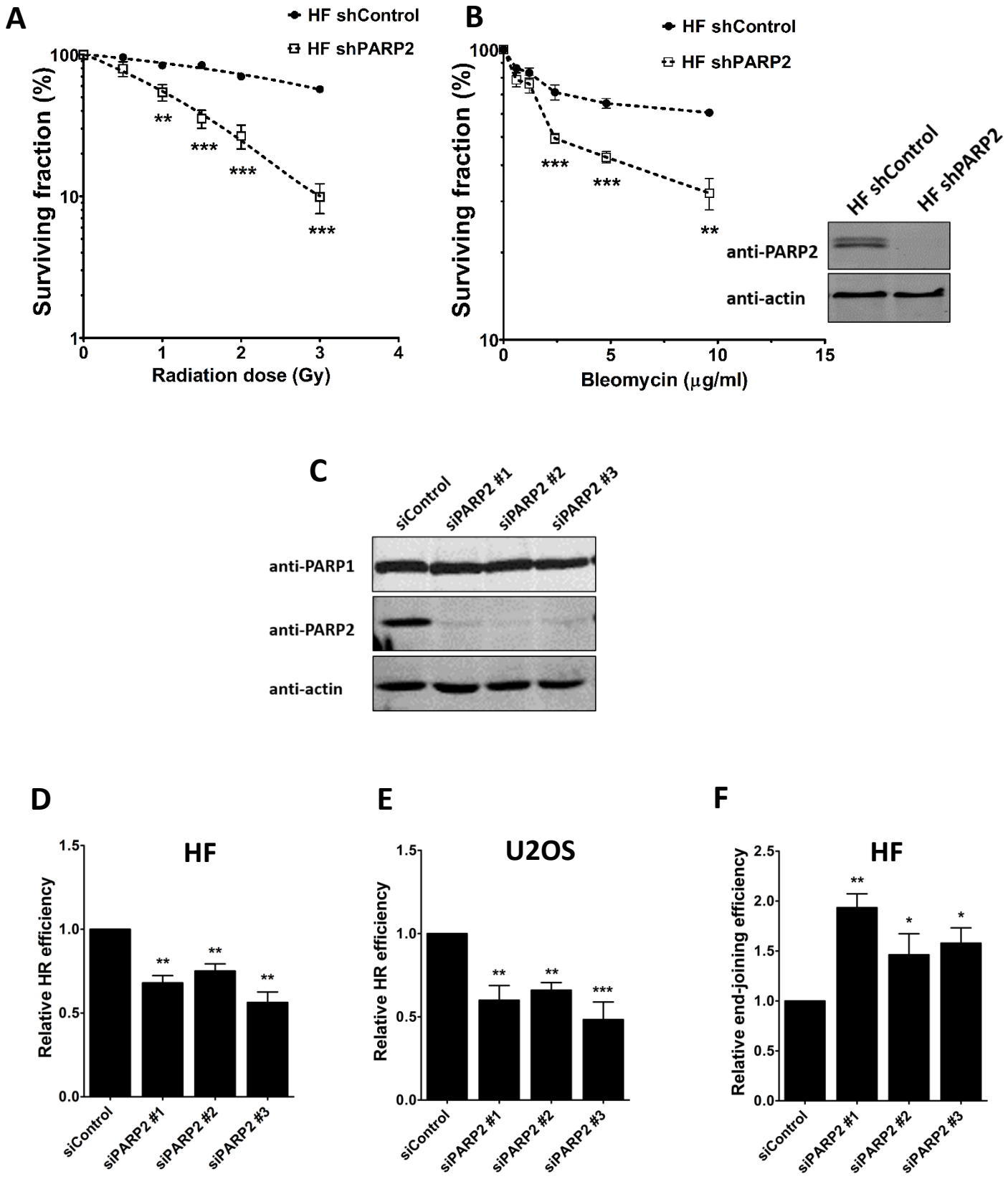
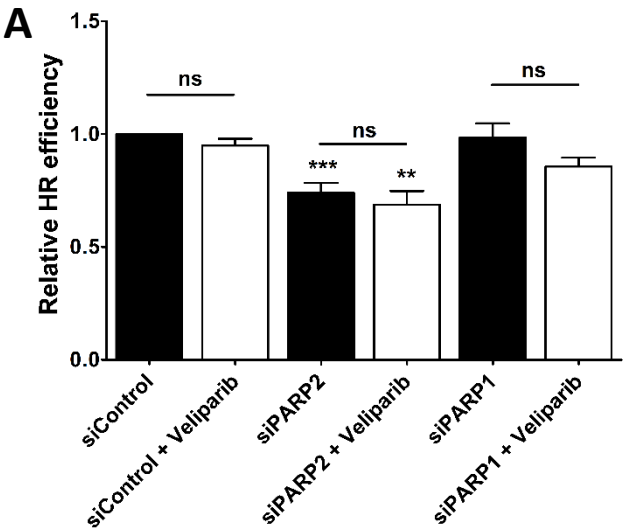
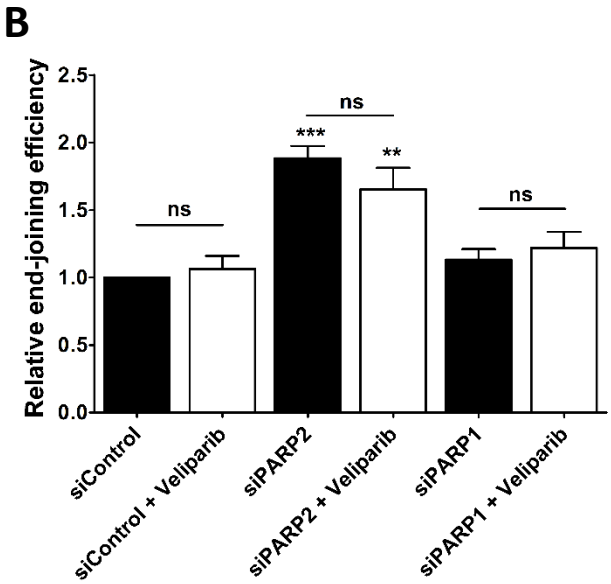
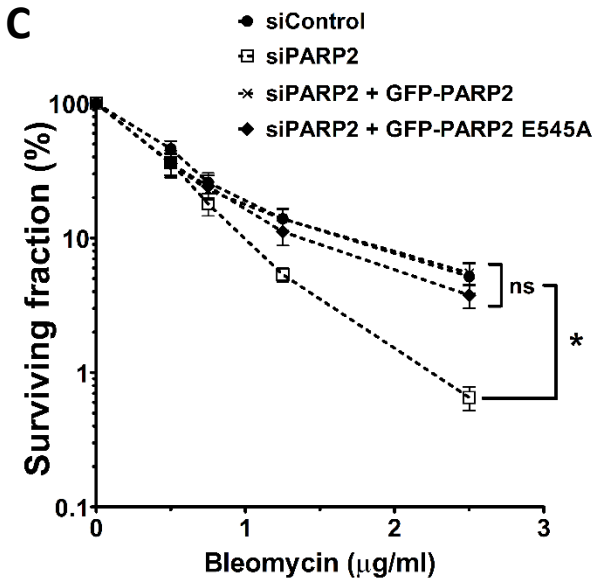
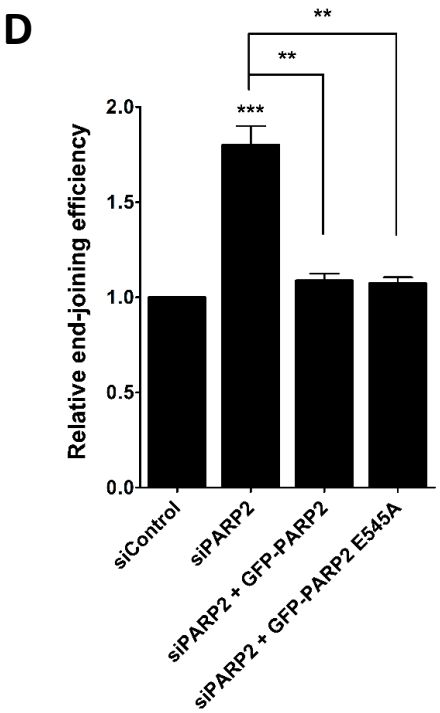


Figure 2 : PARP2 promotes HR and Alt-EJ independently of its catalytic activity









E

	Events limited to the 3'Pnt (%)	Deletions exceeding the 3'Pnt (%)
siControl	50.3	49.7
siPARP2	64.0	36.0
siPARP1	50.0	50.0
siPARP2 + GFP-PARP2	55.5	44.5
siPARP2 + GFP-PARP2 E545A	55.5	44.5

*

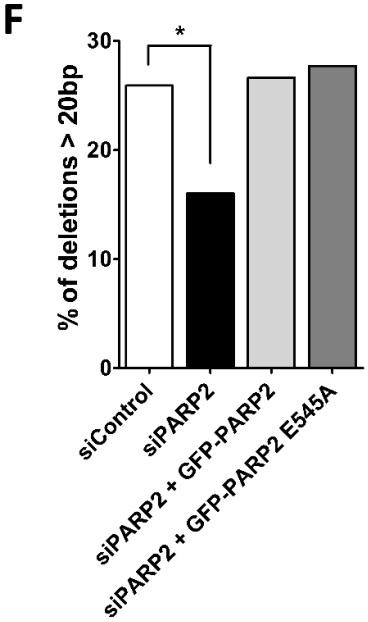
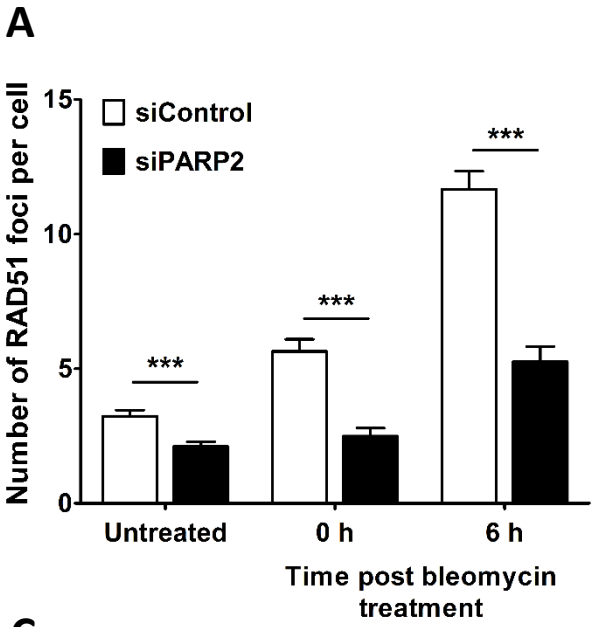
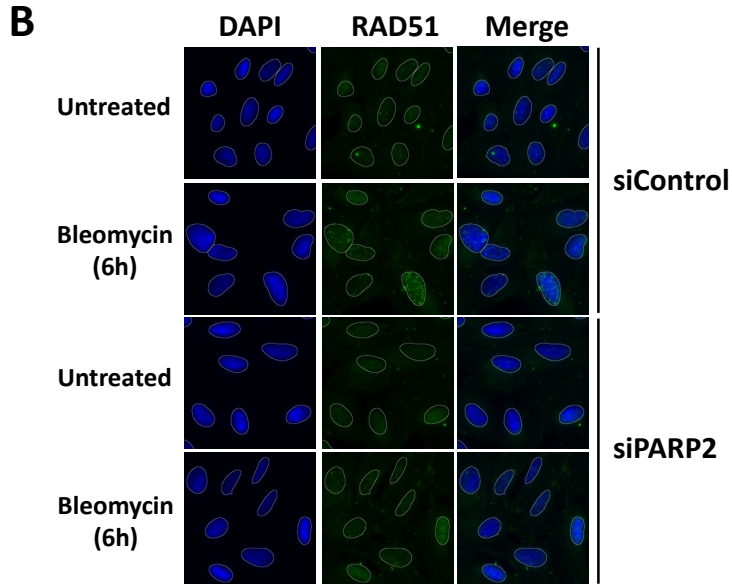
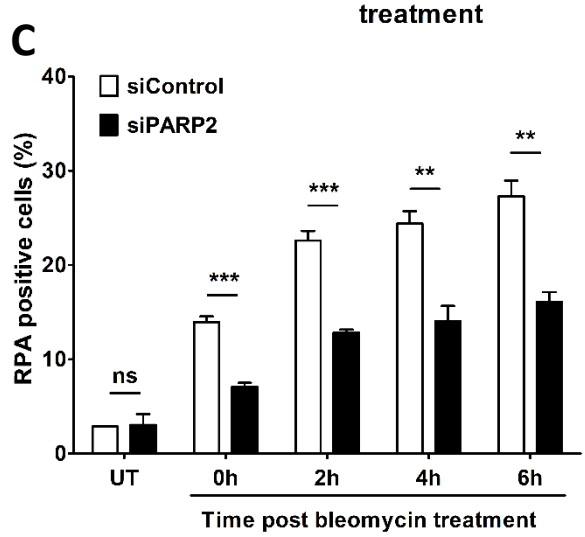
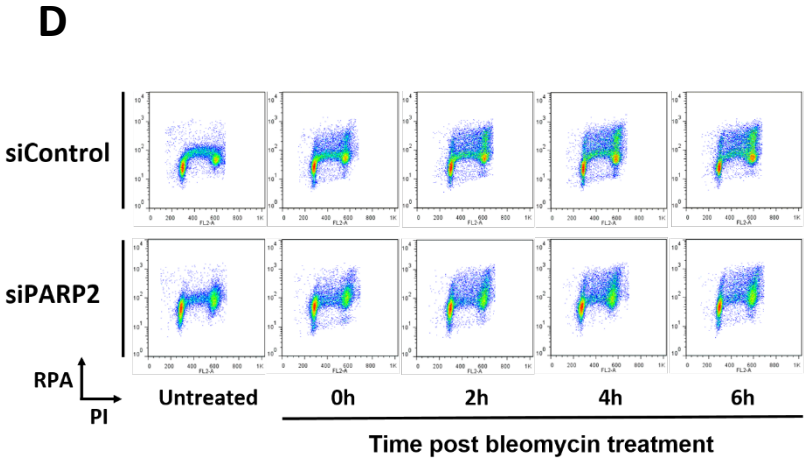


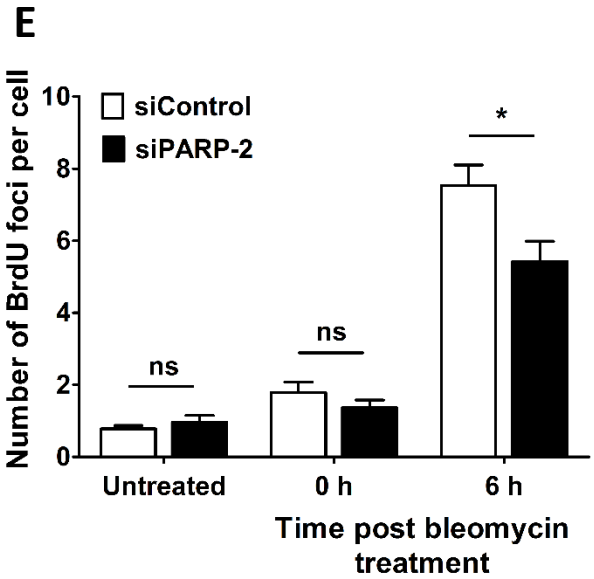
Figure 3 : PARP2 stimulates DNA end-resection











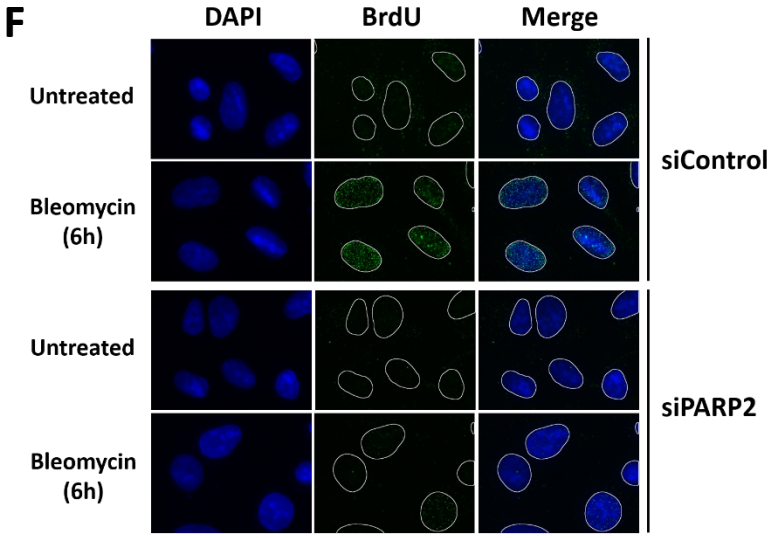
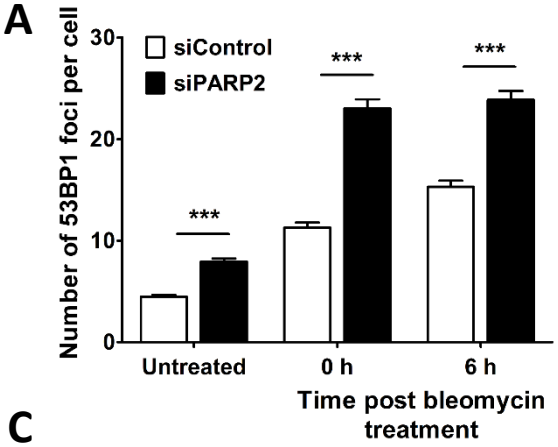
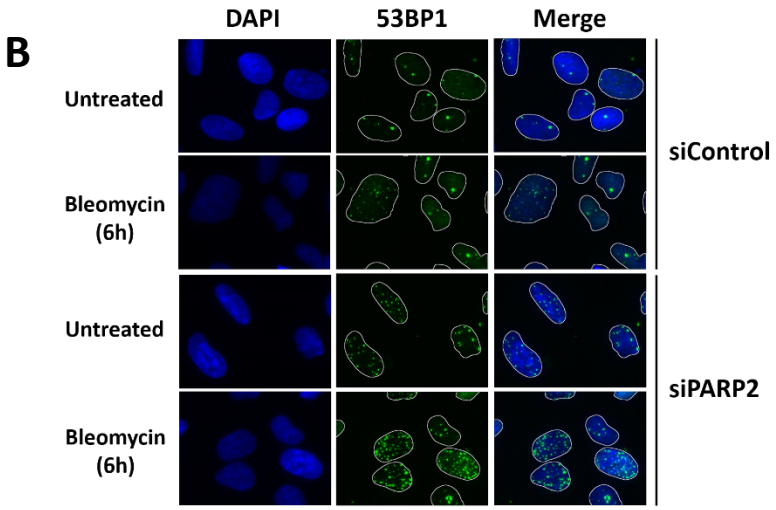
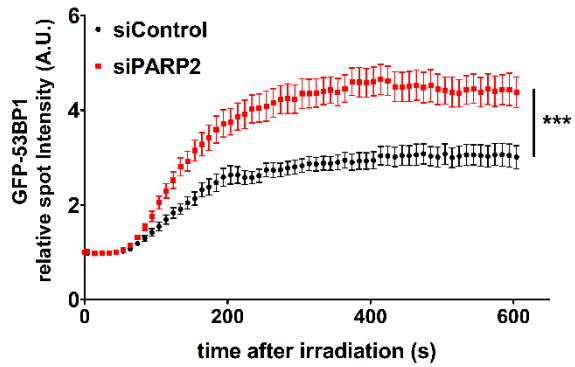
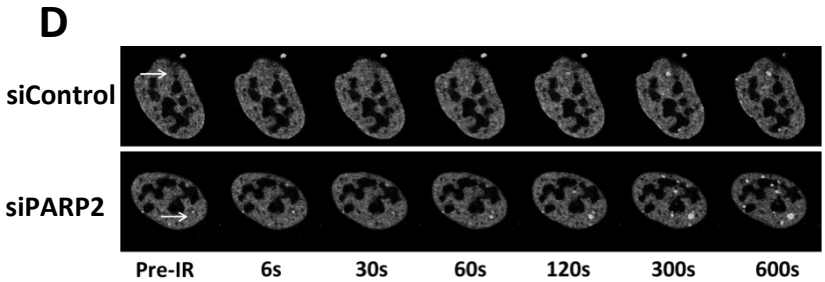


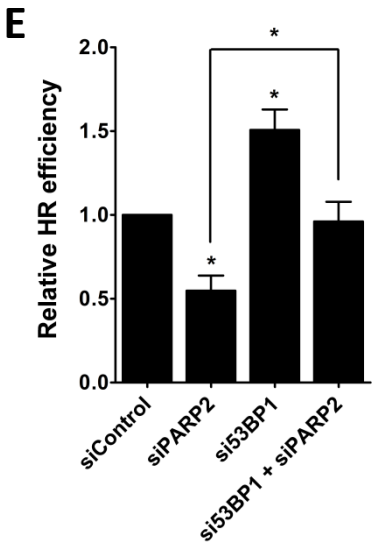
Figure 4 : PARP2 stimulates DNA end-resection by preventing 53BP1 accumulation at broken DNA ends

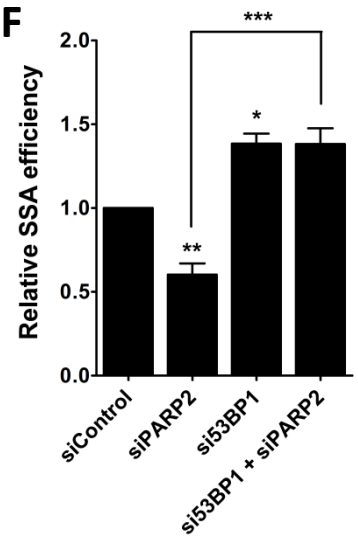


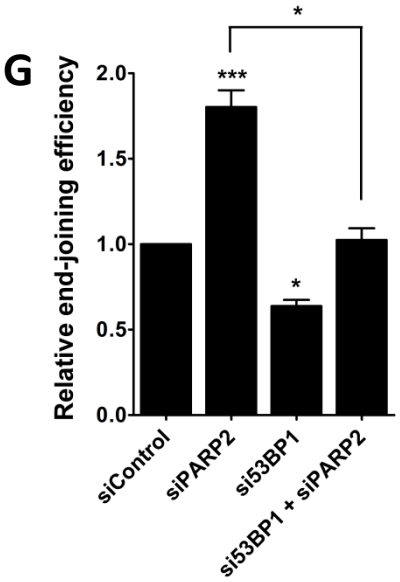












H

	Events limited to the 3'Pnt (%)	Deletions exceeding the 3'Pnt (%)
siControl	50.3	49.7
siPARP2	64.0	36.0
si53BP1	36.4	63.6
si53BP1 + siPARP2	51.2	48.8

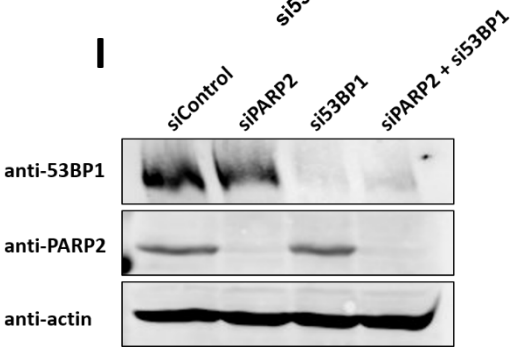
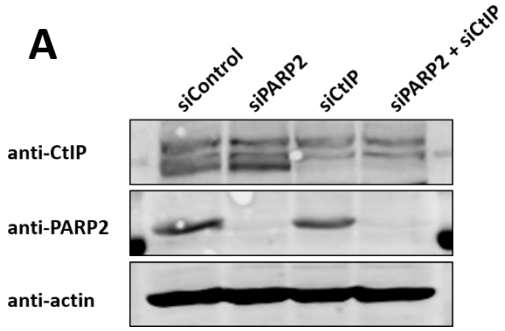
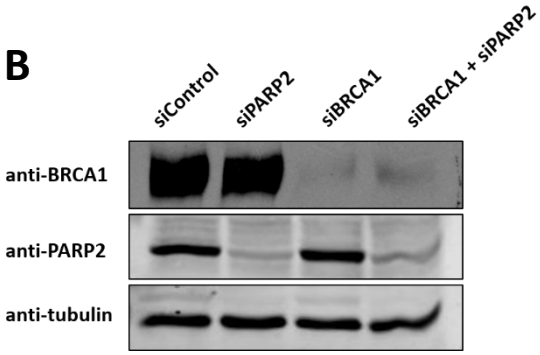
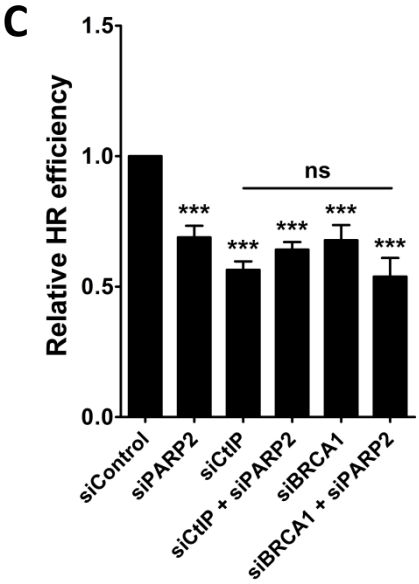
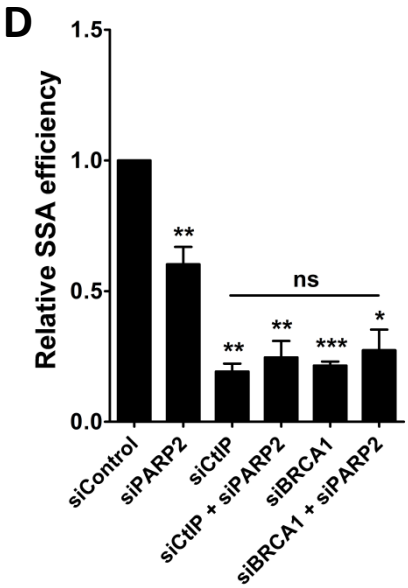


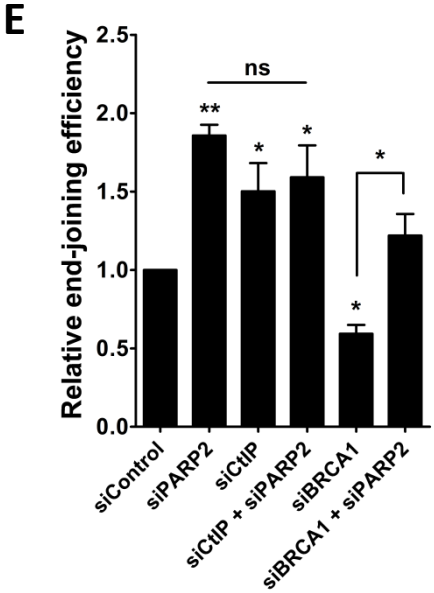
Figure 5 : CtIP is required for PARP2 to stimulate DNA end-resection





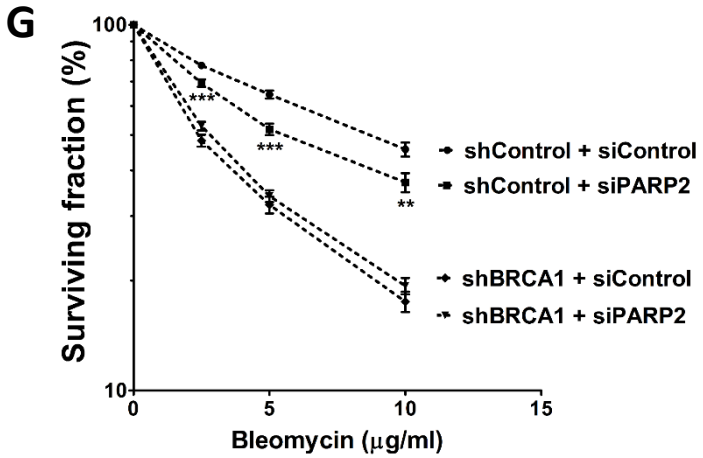






F

	Events limited to the 3'Pnt (%)	Deletions exceeding the 3'Pnt (%)
siControl	50.3	49.7
siPARP2	64.0	36.0
siCtIP	70.4	29.6
siCtIP + siPARP2	69.3	30.7
siBRCA1	76.0	24.0
siBRCA1 + siPARP2	65.2	34.8



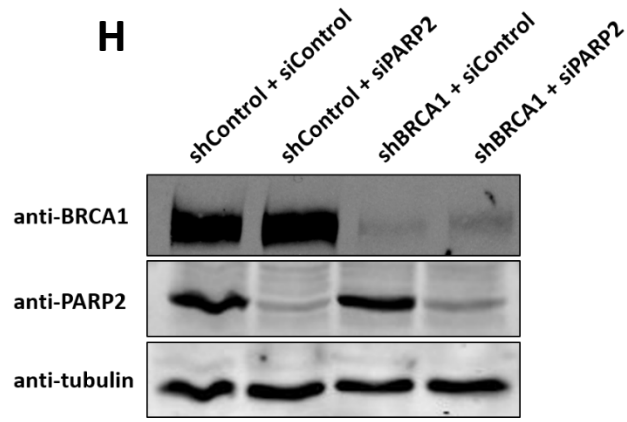


Figure 6 : Model for the role of PARP2 in the DSBR pathway choice

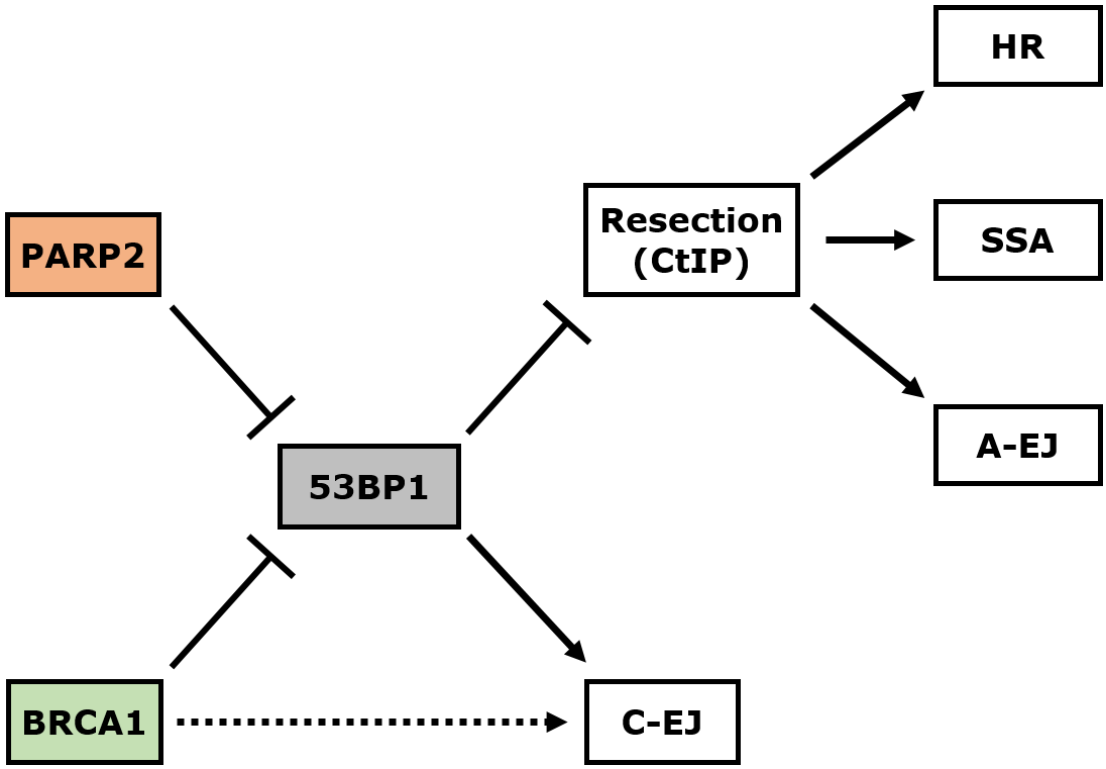


FIGURE LEGENDS

Figure 1: PARP2 depletion alters DSB repair efficiency. (**A**) Effect of PARP2 stable depletion on X-rays induced cytotoxicity measured using a clonogenic surviving assay. The analysis was performed in control SV40-immortalized human fibroblast (HF shcontrol) and in the PARP2 stably depleted cells (HF shPARP2). Each treatment was repeated three times in quadruplicate. Data represents the mean ± SEM. **P<0.01; ***P<0.001 (Mann-Whitney test). (**B**) Clonogenic cell survival of HF shControl or HF shPARP2 cells in response to bleomycin. Cells in suspension were exposed to the indicated bleomycin concentration for 1 h before plating in drug-free media. Each treatment was repeated four times in triplicate. Data represents the mean ± SEM. **P<0.01; ***P<0.001 (Mann-Whitney test). The expression level of the PARP2 protein in the different cell cultures was assessed by western blotting. (**C**) Western blot analysis of whole cell extracts from HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA. Cells extracts were prepared 48 h post siRNA transfection, corresponding to the I-SceI transfection time point. The relative repair efficiency by HR of I-SceI-induced double strand cut is decreased when PARP2 is depleted in (**D**) HF DR-GFP cells and (**E**) U2OS DR-GFP cells. (**F**) The relative repair efficiency by EJ of I-SceI-induced double strand cut is increased when PARP2 is depleted in HF EJ-CD4 cells. Values plotted represent relative repair efficiency calculated as a ratio of repair efficiency measured in cells transfected with siControl. Values are mean ± SEM from five (HF DR-GFP cells), six (U2OS DR-GFP cells) and five (in HF EJ-CD4 cells) independent experiments. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 2: PARP2 promotes HR and A-EJ independently of its catalytic activity. HF DR-GFP cells (**A**) and HF EJ-CD4 cells (**B**) were transfected with the indicated siRNA for two days. When indicated, the PARP inhibitor Veliparib (10 µM) was added to the cell culture medium 1 h before transfection with the DsRed-I-SceI expression plasmid and kept until the relative repair efficiency was analysed. Data represent mean ± SEM from five experiments. **P<0.01; ***P<0.001; ns, not significant. (**C**) Clonogenic cell survival was measured in HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA and complemented with the wild type GFP-PARP2 or the catalytic dead mutant GFP-PARP2 E545A. Cells in suspension were exposed to the indicated bleomycin concentration for 1 h before plating in drug-free media. Each treatment was repeated

four times in triplicate. Data represents the mean ± SEM. *P<0.05; ns, not significant. (**D**) The EJ repair efficiency was measured in HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA and complemented with the wild type GFP-PARP2 or the catalytic dead mutant GFP-PARP2 E545A. Data represent mean ± SEM from three experiments, **P<0.01; ***P<0.001. (**E**) PARP2 depletion lowers the A-EJ repair efficiency. Analysis of the DNA sequence of repair junction from HF EJ-CD4 cells depleted for PARP1 or PARP2 and complemented or not with the wild type GFP-PARP2 or the catalytic dead mutant GFP-PARP2 E545A. The EJ repair events are categorized according to the DNA sequence found at the repair junction. The events limited to the 3'Pnt are repair events for which the sequence at the repair junction includes at least one of the four nucleotides from the 3'Pnt generated by I-SceI cleavage; these events are dependent on the C-EJ pathway. The events with deletion exceeding the 3'Pnt, are events for which the sequence at the repair junction have four or more of the nucleotides at the I-SceI cleavage site that have been deleted; these events are dependent on the A-EJ pathway. Numbers indicate the percentage of junction events of either type and result from the analysis of 36 to 147 junction sequences per condition. (**F**) The graph represents the percentage of events with deletion of more than 20 base pairs at the repair junction. *P<0.05, statistics are presented only when differences are significant.

Figure 3: PARP2 stimulates DNA end-resection. (**A**) Cell transfected for 48 h with the indicated siRNA were untreated or treated for 2 h with 25 µg/ml bleomycin and and fixed immediately after treatment (0 h post bleomycin) or released into drug-free media (6 h post bleomycin). Fixed cells were stained for the immunodetection of RAD51. Data represent mean number of foci per nuclei ± 95% CI from at least 850 cells analysed from three independent experiments. ***P<0.001 (one-way ANOVA test). (**B**) Representative images of U2OS cells fixed on coverslips, and RAD51 immunostained for foci quantification presented in (A). (**C**) The proportion of U2OS cells positive for RPA32 subunit signal is presented in siControl and siPARP2 transfected cells. Cell transfected for 48 h with the indicated siRNA were untreated (UT) or treated for 2 h with 25 µg/ml bleomycin and fixed immediately after treatment (0 h) or released into drug-free media for the indicated times post-treatment. The soluble proteins were extracted and the cells were stained for the immunodetection of the RPA32 subunit and analysed by flow cytometry. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns, not significant. (**D**) Representative flow

cytometry dot plot graphs showing the U2OS cell population treated as indicated and stained with propidium iodide (PI) and for RPA32 (RPA). (**E**) Analysis of the number of BrdU foci in siControl and siPARP2 transfected U2OS cells. Cells were transfected with the indicated siRNA for 48 h were treated or not for 2 h with 25 µg/ml bleomycin and fixed immediately after treatment (0 h) or released into drug-free media (6 h post bleomycin). Cells were then processed for BrdU immunofluorescence without DNA denaturation at the indicated time post-release. Data represent mean number of foci per nuclei ± 95% CI from a total of at least 850 cells analysed from three independent experiments. *P<0.05; ns, not significant (one-way ANOVA test). (**F**) Representative images of U2OS cells fixed on coverslips and BrdU immunostained for foci quantification presented in (E).

Figure 4: PARP2 stimulates DNA end-resection by preventing 53BP1 accumulation at broken DNA ends. (**A**) U2OS cells transfected for 48 h with the indicated siRNA were untreated or treated for 2 h with 25 µg/ml bleomycin and released into drug free media. Cells were fixed immediately after treatment (0 h) or released into drug-free media (6 h post bleomycin) and were stained for the immunodetection of 53BP1. Data represent the mean number of foci per nuclei ± 95% CI from at least 1200 cells analysed from three independent experiments. ***P<0.001 (one-way ANOVA test). (**B**) Representative images of U2OS cells fixed on coverslips, and 53BP1 immunostained for foci quantification presented in (A). (**C**) HeLa cells were transfected with siControl or siPARP2 for 48 h and were subsequently transected for 24 h with GFP-53BP1 fusion protein expression plasmid. For the recruitment analysis, 10 µg/ml Hoechst 33258 was added to the culture media 5 min before induction of DNA damage by micro-irradiation with a two-photon laser (810 nm). The irradiated cells were imaged every 10 s for 10 min. Data represents mean relative spot intensity ± SEM, n = 25–28 individual cells from a minimum of five independent experiments. (**D**) Representative images of the recruitment of the GFP-53BP1 fluorescent-tagged protein. (**E**) The relative repair efficiency by HR is determined in HF DR-GFP cells transfected with the indicated siRNA. Data represent mean ± SEM from four experiments. * P<0.05, statistics are presented only when differences are significant. (**F**) The relative repair efficiency by SSA is determined in U2OS SA-GFP cells transfected with the indicated siRNA. Data represent mean ± SEM from three experiments. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. (**G**) The relative repair efficiency by EJ was measured in HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA. Data

represent mean ± SEM from at least 3 experiments. *P<0.05; ***P<0.001, statistics are presented only when differences are significant. (**H**) Analysis of the DNA sequence of repair junction from HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA. Data represent the percentage of repair events of each class and result from the analysis of 41 to 147 junction sequences per condition. (**I**) Analysis of proteins expression by western blot of cell extracts from HF EJ-CD4 cells from (G) and (H).

Figure 5: CtIP is required for PARP2 to stimulate DNA end-resection. Analysis of (**A**) CtIP or (**B**) BRCA1 protein expression by western blot of whole cell extracts prepared from HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA. Protein extracts prepared 48 h after transfection with the indicated siRNA. The relative repair efficiency of I-SceI-induced double strand ends by (**C**) HR in HF DR-GFP cells or by (**D**) SSA in U2OS cells carrying the SA-GFP substrate was determined as described in Figure 1G. Values are mean ± SEM from at least four (HF DR-GFP) and least three (U2OS SA-GFP) independent experiments. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns, not significant. (**E**) The relative repair efficiency of I-SceI-induced double strand ends by EJ in the HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA was determined. Data represent mean ± SEM from at least three experiments. *P<0.05; **P<0.01; ns, not significant. (**F**) Analysis of the DNA sequence of repair junction from HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA. Data represent the percentage of repair events of each classes of EJ events and result from the analysis of 26 to 147 junction sequences per condition. (**G**) Effect of PARP2 and/or BRCA1 depletion on bleomycin induced HeLa cells cytotoxicity assessed using a clonogenic surviving assay. The HeLa shControl and HeLa shBRCA1 were transfected with the indicated siRNA for 48 h. Cells in suspension were exposed to the indicated bleomycin concentration for 1 h before plating. Each data point represents mean ± SEM of six independent experiments with each dose in triplicate. **P<0.01; ***P<0.001, statistics are presented only when differences are significant (Mann-Whitney test). (**I**) Representative immunoblot showing the levels of the indicated proteins HeLa cells 48 h post transfection with the indicated siRNA.

Figure 6: Model for the role of PARP2 in the DSBR pathway choice.

Figure S1: PARP2 depletion, but not PARP1 depletion alters the efficiency of DSB repair

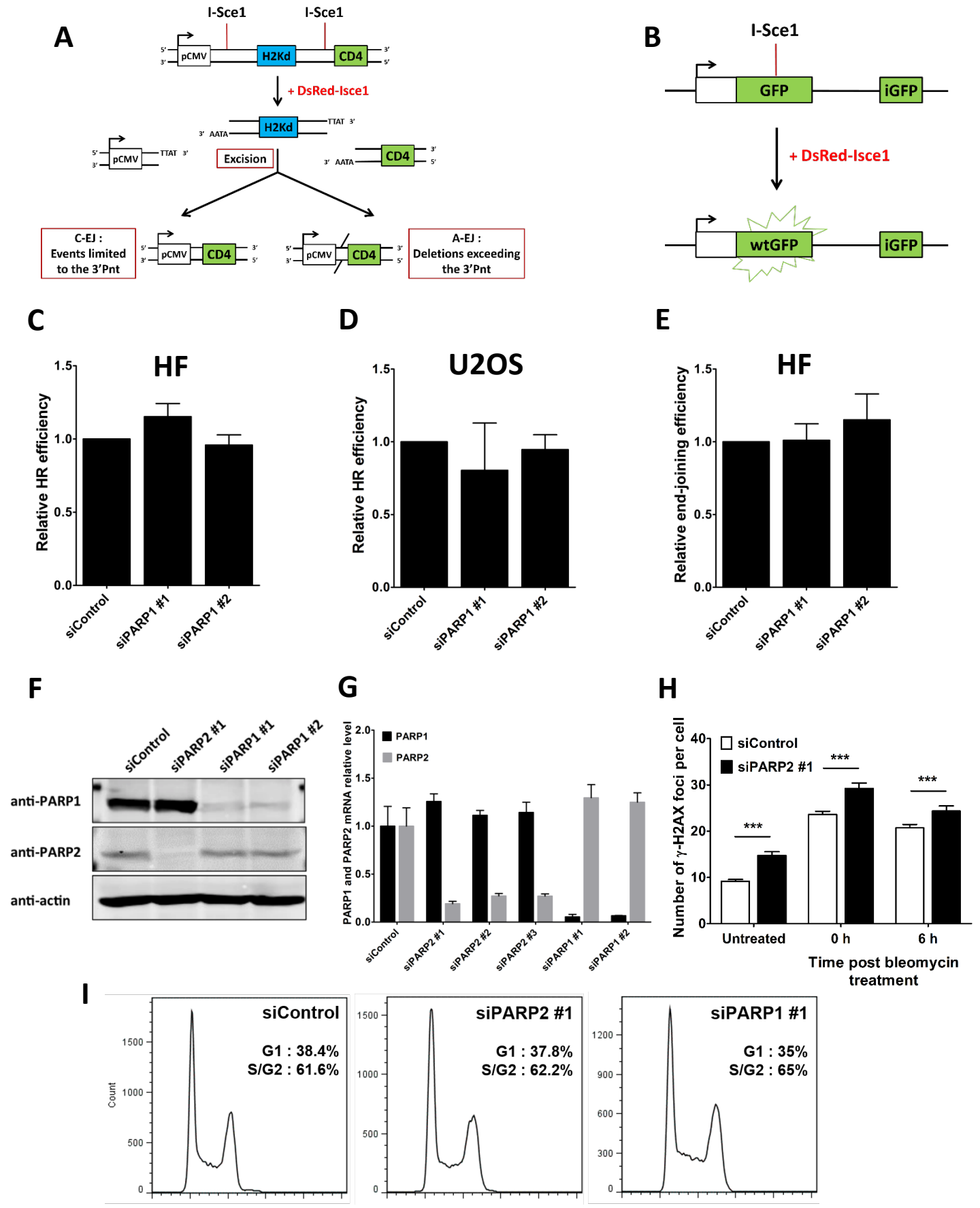
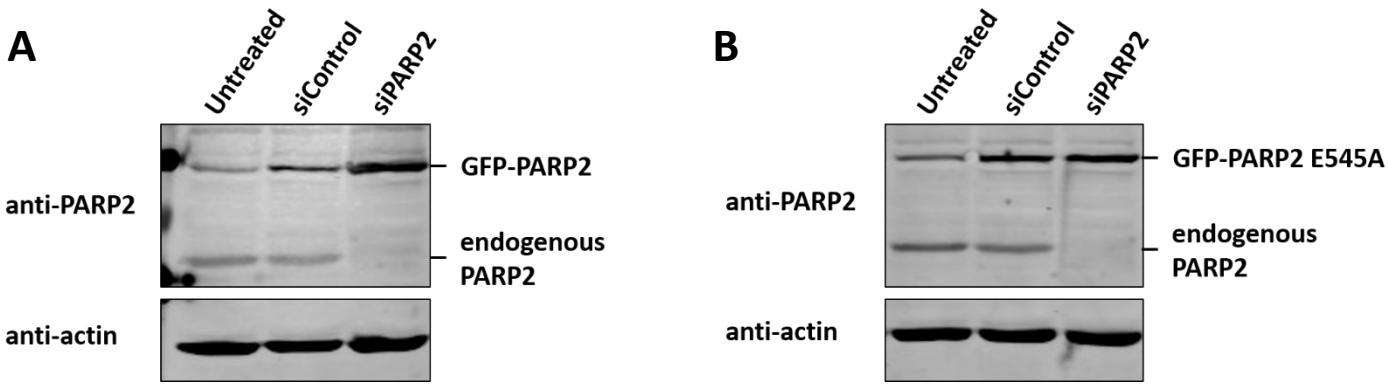


Figure S2 : PARP2 is recruited to the site of laser micro-irradiation induced DNA damage is independent of its catalytic activity



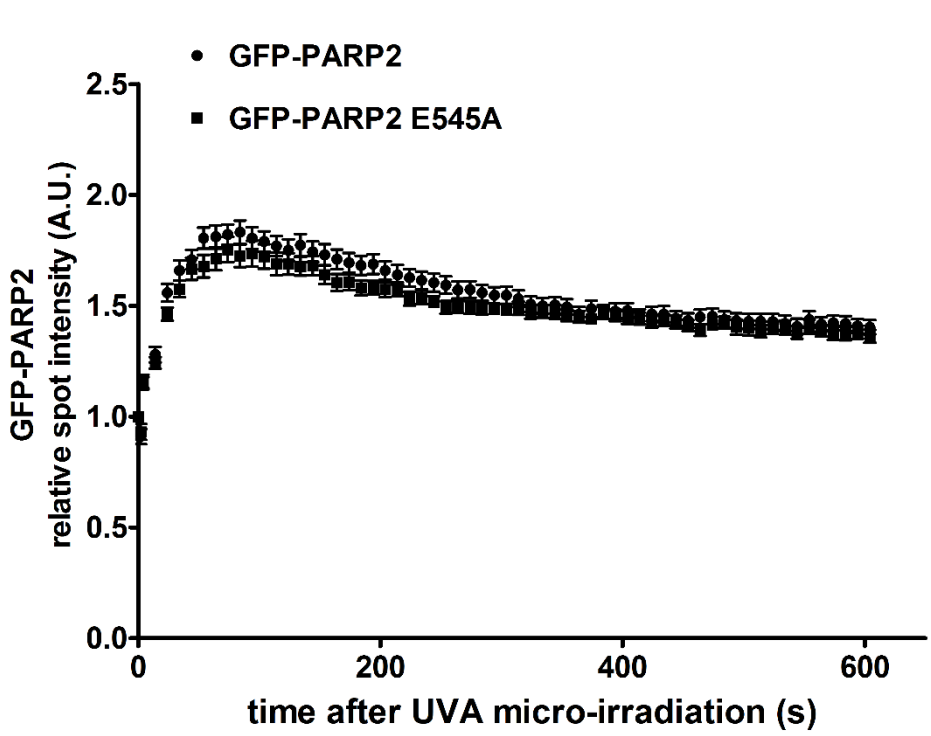
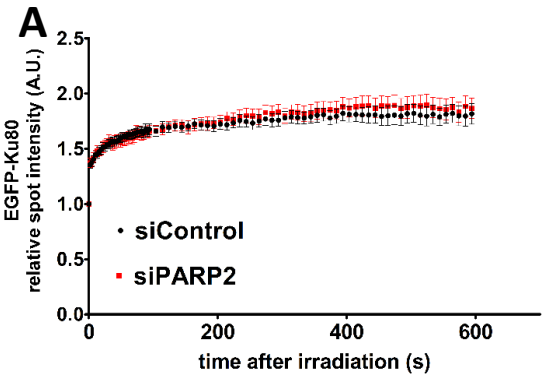
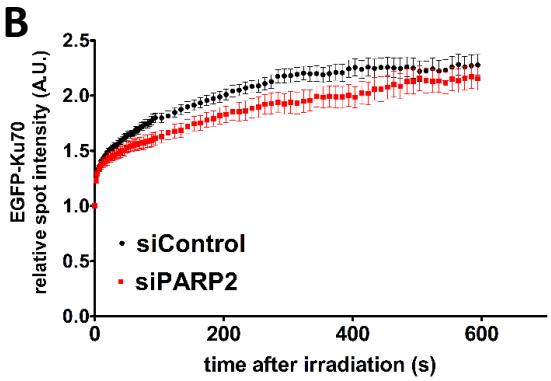
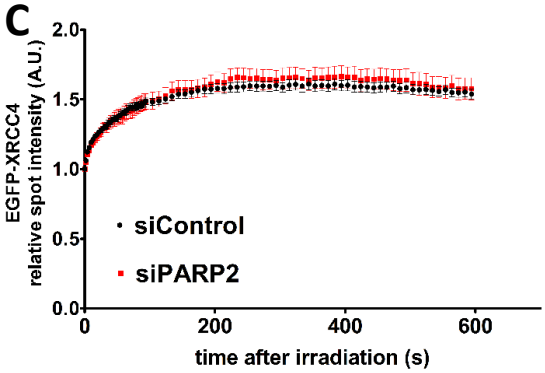
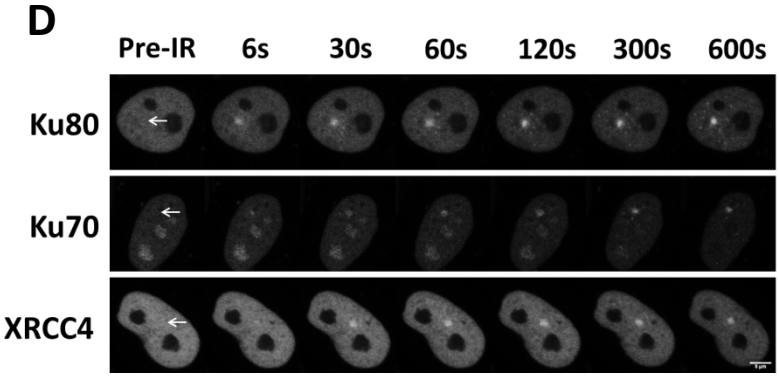


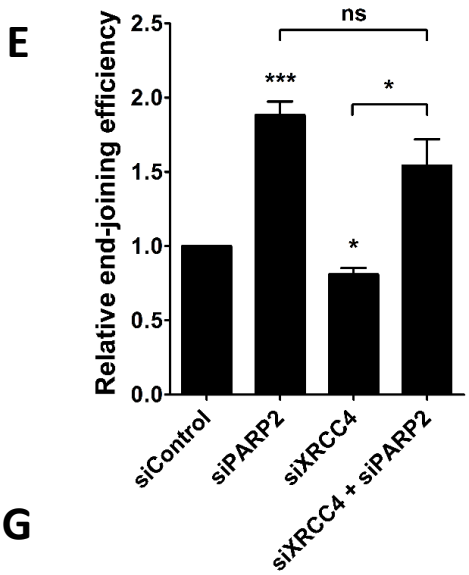
Figure S3: PARP2 does not impede Ku70/80 and XRCC4 proteins recruitment and stimulates DNA end-resection

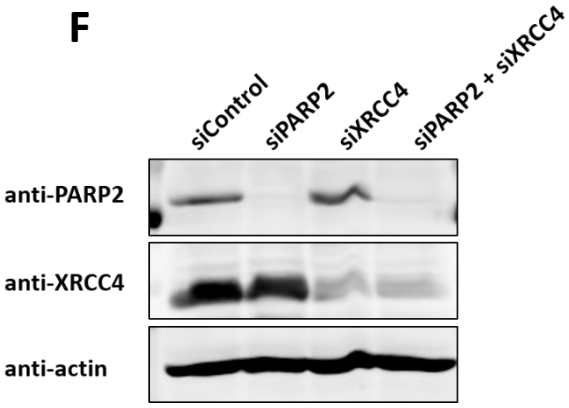


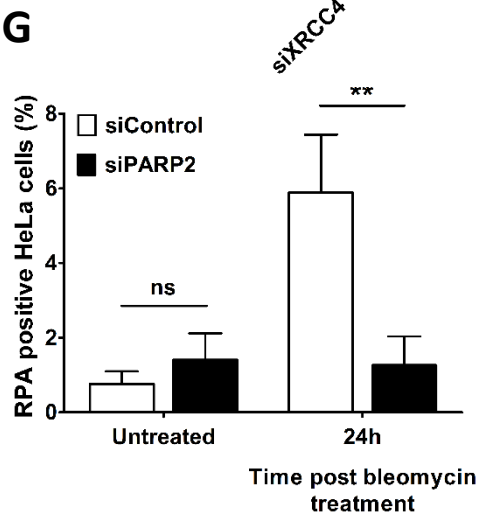












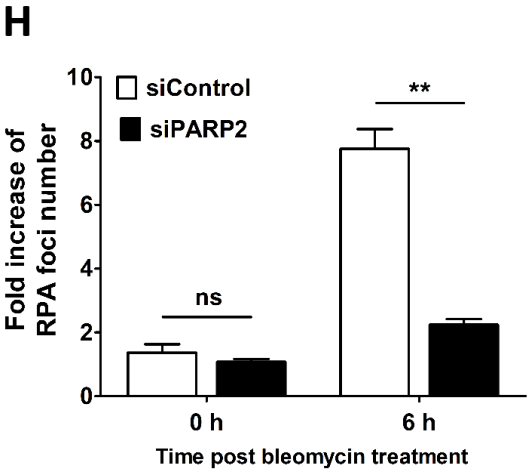


Figure S4 : Silencing of the 53BP1 co-factor, RIF1, partially rescued the HR and EJ efficiency defect in PARP2 depleted cells

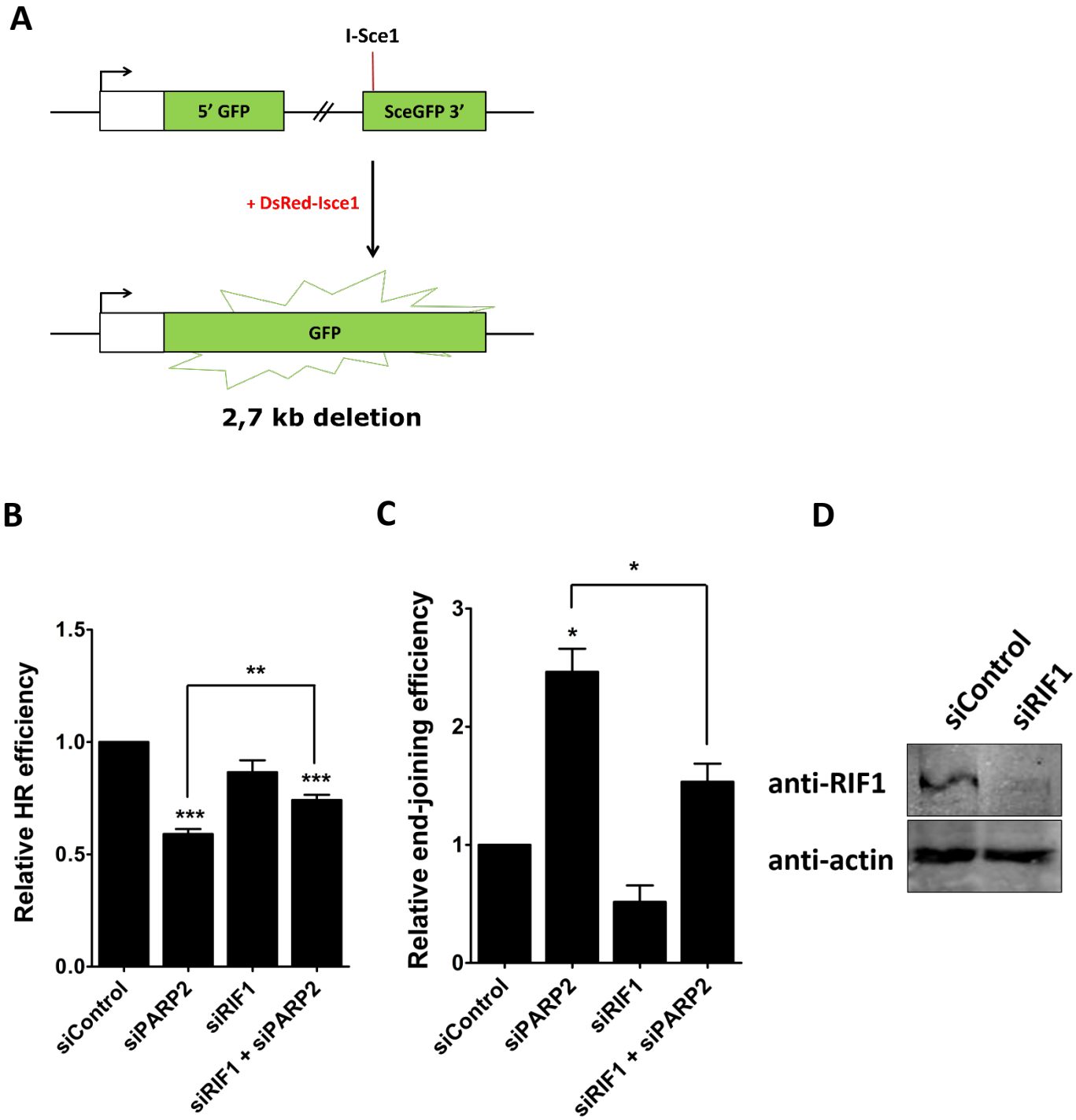
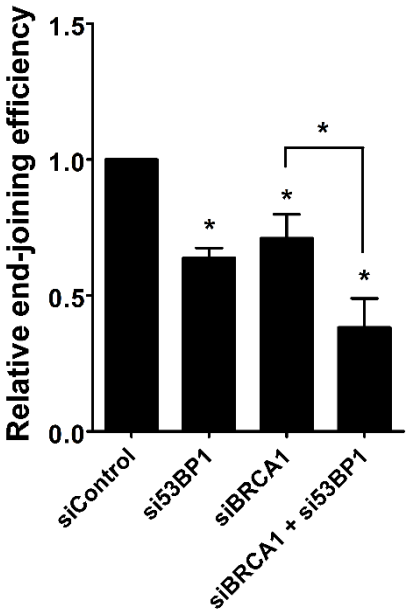


Figure S5 : 53BP1 and BRCA1 have independent roles in promoting EJ



SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1: PARP2 depletion, but not PARP1 depletion, alters the DSB repair efficiency. (**A**) Schematic representation of the end-joining substrate present in a single copy in the genome of the HF EJ-CD4 cell line. Briefly, expression of I-Sce1 allows the repair efficiency by EJ of two double strand cuts separated by 3.2 kb in the substrate. I-Sce1 induced DNA double strand cut produces a 4 pb overhang. The EJ repair junctions are PCR amplified and sequenced. The repair events are categorized according to the DNA sequence found at the repair junction. The events limited to the 3'Pnt are repair events for which the sequence at the repair junction includes at least one of the four nucleotides from the 3' protruding nucleotides (3' Pnt) generated by I-SceI cleavage; these events are dependent on the canonical-EJ (C-EJ) pathway. The events with deletions exceeding the 3'Pnt, are events for which the sequence at the repair junction have four or more of the nucleotides at the I-SceI cleavage site that have been deleted; these events are dependent on the alternative-EJ (A-EJ) pathway. (**B**) Schematic representation of the DR-GFP substrate present in the HF DR-GFP or the U2OS DR-GFP cell lines. The GFP reporter allows homology-directed repair to be scored by flow cytometry after transfection of the I-SceI expression vector. DR–GFP is composed of two differentially mutated GFP genes, 5'GFP and iGFP3' oriented as direct repeats and separated by a drug selection marker, the puromycin N-acetyltransferase gene. The 5'GFP gene, is mutated to contain the recognition site for the rare-cutting I-SceI endonuclease and, as a result, will undergo a DSB when I-SceI is expressed *in vivo*. A gene conversion event within this substrate results in the expression of intact GFP protein, which can be assayed as cellular green fluorescence. (**C**) The relative repair efficiency of the repair by HR was measured in HF DR-GFP cells transfected with the indicated siRNA. Data represent the mean ± SEM from six experiments. (**D**) The relative repair efficiency by HR was measured in U2OS DR-GFP cells transfected with the indicated siRNA. Data represent the mean ± SEM from five experiments. (**E**) The repair efficiency by EJ was measured in HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA. Data represent the mean ± SEM from six experiments. (**F**) Western blot analysis of whole cell extracts from HF EJ-CD4 cells prepared 48 h post-transfection with the indicated siRNA. (**G**) RT-qPCR analysis of *PARP2* and *PARP1* mRNA abundance in HF EJ-CD4 cells 48 h post-transfection with the indicated siRNA. (**H**) Quantification of the number of γH2AX foci determined by immunofluorescence 48 h after

U2OS cells transfection with the indicated siRNA. Transfected cells were untreated or treated for 2 h with 25 μg/ml bleomycin and released into drug free media. Cells were fixed immediately after treatment (0 h) or released into drug-free media (6 h post bleomycin) and were processed for γH2AX detection. Data represent mean number of foci per nuclei ± 95% CI from at least 600 cells from three independent experiments. ***P<0.001 (one-way ANOVA test). (**I**) Cell cycle analysis was performed by flow cytometry 72 h after transfection of the HF DR-GFP cells with the indicated siRNA.

Figure S2: PARP2 is recruited to the site of laser micro-irradiation induced DNA damage is independent of its catalytic activity. Analysis of (**A**) the wild type GFP-PARP2 protein or (**B**) the GFP-PARP2 E545A protein expression by immunoblots of whole cell extracts prepared from HF EJ-CD4 cells. The cells were untreated or treated with the indicated siRNA 48 h before proteins extraction. (**C**) PARP2 catalytic activity is not required for the GFP-PAPR2 recruitment and dissociation at sites of DNA damage induced by laser micro-irradiation. Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of the wild type GFP-PARP2 or the catalytic dead mutant GFP-PARP2 E545A at UV laser-induced DNA damage sites. The irradiated cells were imaged every 10 s for 10 min. Data represents mean relative spot intensity ± SEM, n = 22–34 individual U2OS cells from three independent experiments.

Figure S3: PARP2 does not impede Ku70/80 and XRCC4 proteins recruitment and stimulates DNA end-resection. PARP2 does not affect the recruitment of the central C-EJ proteins Ku80, Ku70 and XRCC4 at laser-induced DNA damage sites. HeLa cells were transfected with siControl or siPARP2 for 48 h and were subsequently transected for 24 h with (**A**) eGFP-Ku80, (**B**) eGFP-Ku70 or (**C**) eGFP-XRCC4 fusion protein expression plasmid. For the recruitment analysis, 10 μg/ml Hoechst 33258 was added to the culture media 5 min before induction of DNA damage by microirradiation with a two-photon laser (810 nm). The irradiated cells were imaged every 10 s for 10 min. Data represents mean relative spot intensity ± SEM, n = 17–36 individual cells from a minimum of three independent experiments. (**D**) Representative images of the recruitment of the indicated fluorescent-tagged proteins. Scale bar : 5 μm. (**E**) PARP2 effect on EJ repair efficiency is independent of XRCC4. The EJ repair efficiency was measured in the HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA. Data represent mean ± SEM from four

experiments. *P<0.05; ***P<0.001. (**F**) Representative immunoblot showing the levels of the indicated proteins from HF EJ-CD4 cells treated as described in (F). (**G**) The proportion of HeLa cells in the G2 phase of the cell cycle that are positive for RPA32 (RPA) signal is presented in siControl and siPARP2 transfected cells. Cell transfected for 48 h with the indicated siRNA were untreated or treated for 2 h with 25 µg/ml bleomycin and released into drug free media for an additional 24 h. The soluble proteins were extracted, the cells were stained for the immunodetection of RPA32 (RPA) and analysed by flow cytometry. ***P<0.001; ns, not significant. (**H**) Analysis of the number of RPA32 (RPA) foci in siControl and siPARP2 transfected U2OS cells. Cells were transfected with the indicated siRNA for 48 h and were treated for 2 h with 25 µg/ml bleomycin. Cells were fixed immediately (0 h) or 6 h after release and immunostained for RPA32. Data represent fold increase in foci number compared to untreated cells ± SEM from a total of at least 850 cells from three independent experiments. **P<0.01; ns, not significant (one-way ANOVA).

Figure S4: Silencing of the 53BP1 co-factor, RIF1, partially rescued the HR and EJ efficiency defect in PARP2 depleted cells. (**A**) Schematic representation of the SA-GFP substrate. The SA-GFP reporter consists of the GFP gene fragments 5'GFP and SceGFP3', which have 266 bp of homology. Repair of the I-SceI-generated DSB in SceGFP3' by SSA results in a functional GFP gene when a DNA strand from SceGFP3' is annealed to the complementary strand of 5'GFP, followed by appropriate DNA-processing steps. As a result, SSA between the homologous sequences in the GFP gene fragments produces a 2.7-kb deletion in the chromosome. The repair efficiency of I-SceI-induced double strand ends by (**B**) HR was measured in HF DR-GFP cells and by (**C**) EJ was measured in HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA. Data represent the mean ± SEM from five experiments (HF DR-GFP) and mean ± SEM from three experiments (HF EJ-CD4). *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001, statistics are presented only when differences are significant. (**D**) Analysis of proteins expression by western blot of cell extracts from HF EJ-CD4 cells transfected with the indicated siRNA for 48 h.

Figure S5: 53BP1 and BRCA1 have independent roles in promoting EJ. The EJ relative repair efficiency of the I-SceI-induced double strand ends was measured in the HF EJ-CD4 cells

transfected with the indicated siRNA. Data represent mean ± SEM from three experiments. *P<0.05.

Table S1: The table lists the DNA sequences of all repair junctions from HF EJ-CD4 cells, transfected with the indicated siRNA, analysed in the present study.

Résultats non publiés

Pour comprendre le mécanisme par lequel PARP2 régule l'accumulation de 53BP1 nous avons décidé d'analyser si PARP2 pouvait moduler la cascade de signalisation permettant le recrutement de 53BP1 à la chromatine. L'une des deux modifications cruciales assurant le recrutement de 53BP1 aux sites de dommages de l'ADN est l'ubiquitinylation de H2AK15, qui est induite par la voie RNF8-RNF168 en réponse aux dommages de l'ADN (Doil et al., 2009; Fradet-Turcotte et al., 2013). Il a été observé qu'un traitement court avec un inhibiteur du protéasome, le MG-132, abolit la formation des foyers 53BP1 après l'induction de CDBs de l'ADN dans la lignée cellulaire U2OS (Chroma et al., 2017). En revanche, les foyers 53BP1 sont résistants au traitement par le MG-132 dans des lignées cellulaires qui surexpriment les protéines RNF8 et RNF168, comme la lignée MDA-MB-231. De plus, la surexpression exogène de RNF168 dans la lignée U2OS restaure la formation des foyers 53BP1 en présence de MG-132. Ces informations indiquent que la sur-activation de la voie RNF8-RNF168 est associée avec la persistance des foyers 53BP1 lorsqu'un traitement au MG-132 précède l'induction de CDBs. Nous avons donc postulé que si PARP2 agit sur l'accumulation de 53BP1 par l'intermédiaire de la voie RNF8-RNF168, la présence de foyers 53BP1 résiduels en présence de l'inhibiteur du protéasome devrait être visible.

Nous avons donc déplété la lignée U2OS pour PARP2, et traité ces cellules avec une combinaison de MG-132 et de bléomycine pour induire des CDBs de l'ADN. Le MG-132 est ajouté 2 heures avant le traitement à la bléomycine et maintenu jusqu'à la fixation des cellules (voir Figure 28). A nouveau, la déplétion de PARP2 est associée avec une forte augmentation du nombre de foyers 53BP1 après l'induction de CDBs par la bléomycine. Un pré-traitement avec le MG-132 abolit totalement la formation de foyers 53BP1 autant dans les cellules contrôle que dans les cellules déplétées pour PARP2. Cette observation suggère que la voie RNF8-RNF168 n'est pas suractivée en absence de PARP2 et que PARP2 régule l'accumulation de 53BP1 par un mécanisme indépendant.

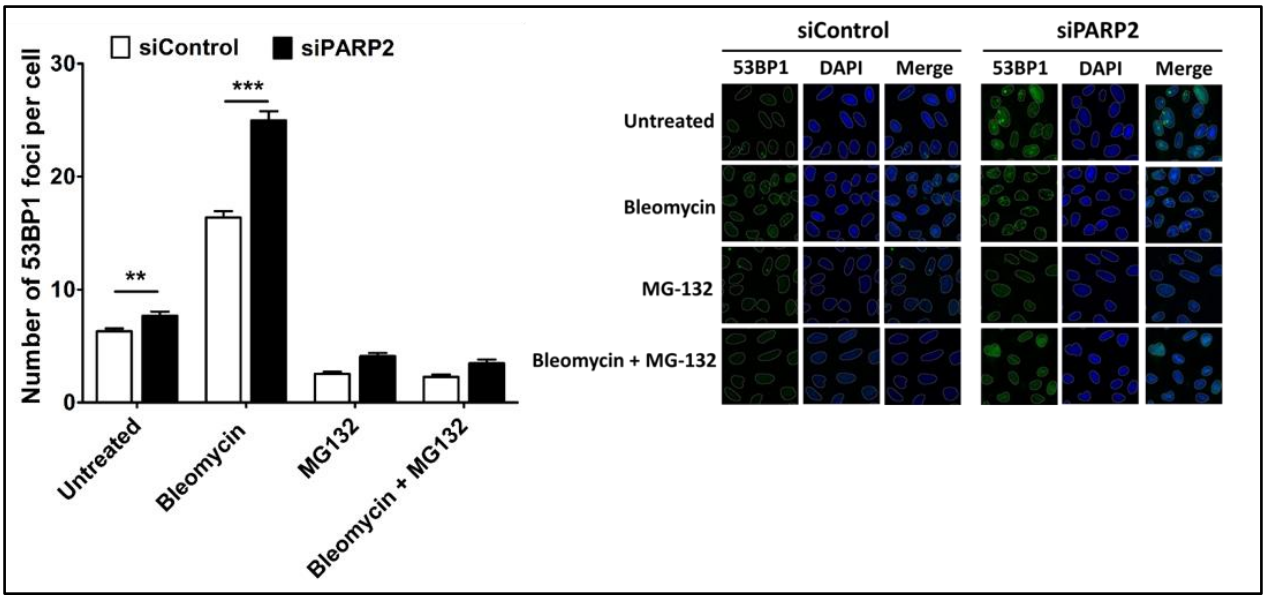


Figure 28 : La déplétion de PARP2 n'affecte pas la résistance des foyers 53BP1 à un inhibiteur du protéasome. Les cellules sont déplétées pour PARP2 avec le siARN PARP2 #1 ou avec transfectées le siControl à 20nM pendant 48 heures. Après un pré-traitement avec 5µM de DMSO ou de MG-132 pendant 2 heures, le milieu est remplacé par un milieu contenant 25µg/ml de bléomycine et/ou du MG-132 et les cellules sont incubées pendant 2 heures successives avant fixation. Le panel de gauche représente le nombre moyen de foyers par noyau et la barre d'erreur est l'intervalle de confiance à 95%. Les différences statistiques ont été mesurées par ANOVA. ***P<0.001 ; **P<0.01. Au moins 1000 noyaux ont été analysés pour chaque condition et chaque expérience a été répétée un minimum de 3 fois.

Nous avons aussi souhaité déterminer si PARP2 pouvait interagir avec 53BP1 ou ses partenaires. En effet, sachant que PARP2 régule les voies de la réparation des CDBs indépendamment de son activité enzymatique, une des hypothèses les plus probables est que cette régulation nécessite des interactions protéines-protéines. Par immunoprécipitation, nous avons donc déterminé si PARP2 pouvait interagir avec 53BP1 ou avec son partenaire RIF1. En effet la protéine RIF1 est un candidat attractif, puisque une PARP2 a récemment été identifié parmi les dix partenaires protéiques majoritaires de RIF1 (Zhang et al., 2016).

Pour cela, nous avons immunoprécipité GFP-PARP2 et analysé la présence de partenaires protéiques. PARP2 interagit avec PARP1 ou encore Ku80 comme précédemment décrit (Isabelle et al., 2010; Schreiber et al., 2002). De plus, nous avons pu ainsi confirmer l'existence d'une interaction entre PARP2 et RIF1 et cela à plusieurs reprises (voir figure 29). Cette interaction visible entre PARP2 et RIF1 ne semble pas être dépendante de l'induction de dommages de l'ADN (données non présentées dans ce manuscrit). En revanche, nous n'avons pas été en mesure de mettre

en évidence une interaction entre PARP2 et 53BP1, BRCA1 ou encore CtIP (données non présentées dans ce manuscrit). Ces données suggèrent un possible lien entre PARP2 et RIF1 dans la régulation de l'accumulation de 53BP1, puisque RIF1 contrôle la reconnaissance de H4K20me2 par le domaine Tudor de 53BP1 (Drané et al., 2017).

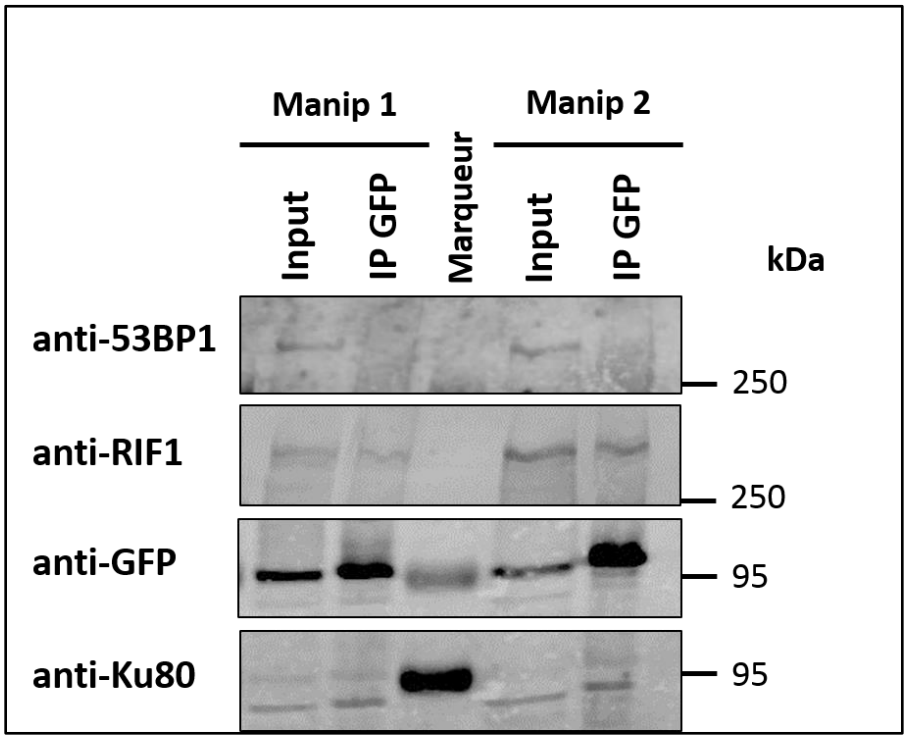


Figure 29 : PARP2 interagit avec RIF1 et Ku80. L'immunoprécipitation a été réalisée sur des extraits protéiques totaux, obtenus dans la lignée U2OS qui exprime de façon stable la protéine GFP-PARP2 sauvage. La lyse est faite dans un tampon à 0.1% de NP-40, puis la protéine PARP2 fusionnée à la GFP est immunoprécipitée avec un anticorps anti-GFP fusionné à des billes magnétiques. Après trois étapes de lavage dans le tampon de lyse, les protéines sont éluées dans du tampon laemmli et déposées sur gel d'acrylamide.

Nous avons donc souhaité savoir si PARP2 pouvait contrôler l'accumulation de RIF1 aux sites de dommages de l'ADN. Pour cela, nous avons tout d'abord souhaité analyser la cinétique de recrutement de EGFP-RIF1 aux sites de microirradiation laser en absence de PARP2. Cependant, malgré toutes les tentatives effectuées, je n'ai pas été en mesure de détecter une accumulation de RIF1 après microirradiation laser (données non présentées).

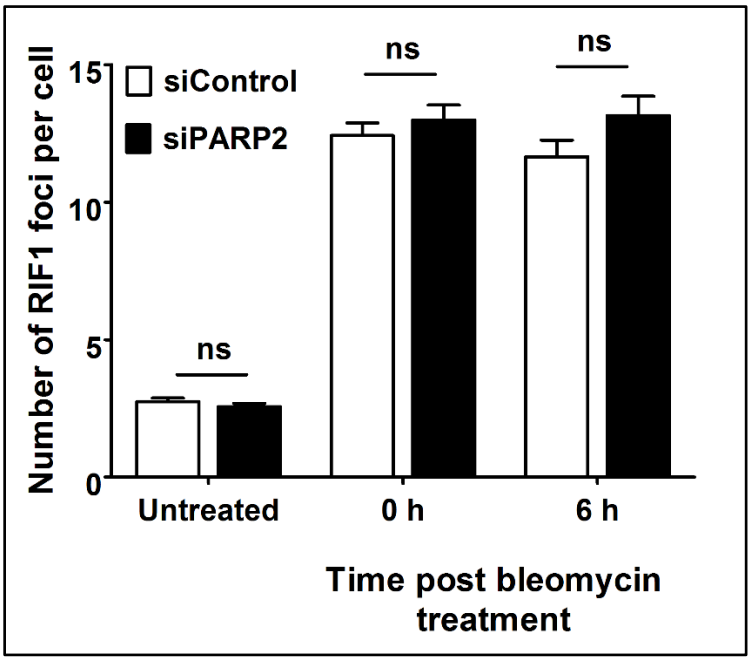


Figure 30 : PARP2 n'affecte pas la formation des foyers RIF1 en réponse aux dommages à l'ADN. Le nombre de foyers RIF1 par noyau a été déterminé par immunofluorescence dans les cellules U2OS non-traitées (untreated) ou dans les cellules traitées 2h avec 25ug/ml de bléomycine puis fixées immédiatement (0 h) ou après avoir été relâchées en milieu sans drogue pendant 6 heures (6 h). Les histogrammes représentent le nombre moyen de foyers par noyau. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% issu des données de quatre expériences représentant un minimum de 1200 noyaux. La significativité est déterminée par ANOVA. ns : non significatif.

Nous nous sommes donc tournés vers une approche d'immunofluorescence pour détecter la formation de foyers RIF1 en réponse aux CDBs induites par la bléomycine. Nous avons ainsi observé que la déplétion de PARP2 n'affecte pas la formation des foyers RIF1 spontanés ou en réponse à l'induction de CDBs induites par un traitement à la bléomycine. Ces données suggèrent donc que PARP2 n'affecte pas le recrutement ou la dissociation de RIF1 des sites de dommages de l'ADN, contrairement à ce qui a été décrit pour 53BP1.

Ces observations complémentaires nous permettent de conclure que les fonctions de PARP2 qui contribuent à limiter l'accumulation de 53BP1 sur la chromatine endommagée sont indépendantes de la voie RNF8-RNF168 et peut-être aussi indépendantes de l'interaction entre PARP2 et RIF1.

TROISIEME PARTIE :

La déphosphorylation de la protéine plateforme XRCC1 régule son recrutement aux sites de dommages de l'ADN

Introduction

La protéine XRCC1 est essentielle au cours de la réparation des dommages de bases et des CSBs de l'ADN. XRCC1 ne possède pas d'activité enzymatique mais joue un rôle de plate-forme pour coordonner les étapes de la réparation en stimulant le recrutement et/ou l'activité des enzymes impliquées dans la voie du BER. Pour résumer ce qui a été présenté dans l'introduction, XRCC1 stimule l'activité des glycosylases impliquées dans l'élimination des bases endommagées, (Campalans et al., 2005; Marsin et al., 2003), des protéines PNKP, APTX et APE1 qui sont impliquées dans la maturation des extrémités (Ali et al., 2009; Becherel et al., 2010; Loizou et al., 2004; Luo et al., 2004; Vidal et al., 2001; Whitehouse et al., 2001), recrute, stabilise et stimule l'activité de la polymèrase β (Dianova et al., 2004; Parsons et al., 2008; Petermann et al., 2006) et finalement, stabilise l'ADN ligase 3 (Caldecott et al., 1995; Taylor et al., 1998).

L'importance cruciale de XRCC1 dans la prise en charge des lésions de l'ADN et l'association de certains polymorphismes de XRCC1 avec des susceptibilités à développer un cancer, a amené plusieurs équipes de recherche à étudier les mécanismes régulant les fonctions de cette protéine, et en particulier ses modifications post-traductionnelles. En effet, les analyses des modifications post-traductionnelles de XRCC1 ont permis de montrer que la protéine XRCC1 est phosphorylée, acétylée, glycosylée, modifiée par ubiquitination et par poly(ADP-ribosylation), et que la protéine XRCC1 peut être dans différents états d'oxydoréduction.

Tout d'abord, les PAR synthétisés par PARP1 et PARP2 sont responsable de la majorité du recrutement de XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN (Caldecott, 2003; Godon et al., 2008; Lan et al., 2004; Mortusewicz et al., 2007; Okano et al., 2003). Ce recrutement rapide de XRCC1 est permis par le motif de reconnaissance des PAR qui est présent au sein du domaine BRCT1 de XRCC1 ou par l'intégralité du domaine BRCT1 (Breslin et al., 2015; El-Khamisy et al., 2003; Li et al., 2013; Okano et al., 2003; Pleschke et al., 2000b). De plus, XRCC1 est aussi directement modifié par les PARPs en réponse aux dommages de l'ADN (Jungmichel et al., 2013b; Schreiber et al., 2002; Zhang et al., 2013b). Une étude plus récente semble indiquer que PARP1 et PARP2 et non PARP3 modifient XRCC1 sur de multiples sites, en particulier dans le domaine BRCT1 de XRCC1 (Gibson et al., 2016). Le rôle fonctionnel de la PARylation sur les fonctions de XRCC1 n'est pas caractérisé à ce jour. Cependant, le domaine BRCT1 est critique pour assurer les fonctions

de XRCC1 dans la réparation. L'introduction de mutations ponctuelles au sein de ce domaine sensibilisent très fortement les cellules CHO aux agents alkylants et conduisent à une accumulation de CSBs dans toutes les phases du cycle cellulaire, suggérant un rôle important de la PARylation de XRCC1 (Taylor et al., 2002). La forme PARylée de XRCC1 pourrait aussi favoriser le recrutement ou la stabilisation d'autres protéines de la réparation alors même que PARP1 et PARP2 se sont préalablement dissociées du site de dommage de l'ADN. Finalement, XRCC1 interagit aussi directement avec PARP1 et PARP2 et régule négativement leur activité (Masson et al., 1998b; Schreiber et al., 2002).

La phosphorylation de XRCC1 a été décrite pour la première fois en 2003 (Kubota and Horiuchi, 2003). Cette étude indique que XRCC1 est phosphorylé de façon constitutive et est hyperphosphorylé en réponse aux dommages de l'ADN induits par un agent alkylant. Des cribles à grandes échelles indiquent que plus de 40 acides aminés de XRCC1 peuvent être la cible de phosphorylation (Dephoure et al., 2008; Gauci et al., 2009; Mayya et al., 2009). A ce jour, les trois kinases CHK2, DNA-PK et CK2 ont été impliquées dans la phosphorylation de XRCC1 (Chou et al., 2008; Levy et al., 2006; Loizou et al., 2004). Il semble que l'activité de ces trois protéines affecte les fonctions de XRCC1.

Tout d'abord, XRCC1 est phosphorylée en réponse aux dommages dans l'interdomaine 1 par la kinase Chk2 en position 284 (Chou et al., 2008). Cette phosphorylation stimule la réparation des dommages induits par un agent alkylant potentiellement en favorisant l'interaction de XRCC1 avec les glycosylases MPG et UNG2.

XRCC1 est également phosphorylée en réponse aux dommages dans le domaine BRCT1 en position 371 par DNA-PK (Levy et al., 2006). Cette phosphorylation inhibe la dimérisation de XRCC1 et stimule la résolution des foyers γH2AX en réponse aux dommages de l'ADN induits par les radiations ionisantes par un mécanisme qui n'est pas encore caractérisé.

Finalement, il a aussi été observé que l'interdomaine 2 de XRCC1 est phosphorylé sur de multiples sites par CK2, ce qui favorise son interaction avec le domaine FHA de la protéine PNKP, et stimule le recrutement ainsi que les activités kinase et phosphatase de PNKP (Loizou et al., 2004; Lu et al., 2010). Même si ces phosphorylations de l'interdomaine 2 de XRCC1 stimulent la cinétique de réparation des CSBs, elles ne sont en revanche pas nécessaires pour assurer la survie cellulaire en réponse aux radiations ionisantes ou au stress oxydatif induit par le H2O2 (Loizou et

al., 2004; Luo et al., 2004; Ström et al., 2011). Ceci pourrait être expliqué par l'observation que la forme non phosphorylée de XRCC1 est tout de même capable de stimuler l'activité de PNKP ainsi que de faciliter son turnover aux sites de dommages de l'ADN (Lu et al., 2010; Mani et al., 2007; Whitehouse et al., 2001). Egalement, la phosphorylation de l'interdomaine 2 de XRCC1, d'une part stimule le recrutement de XRCC1 à la chromatine en réponse aux dommages (Loizou et al., 2004), et d'autre part facilite la dissociation de XRCC1 des sites de dommages (Wei et al., 2013). Au final, bien que les cinétiques de recrutement et de dissociation de ces protéines soient perturbées, il semble que les dommages à l'ADN sont réparés, néanmoins la fidélité de cette réparation reste à déterminer.

L'interaction de XRCC1 avec les domaines FHA des protéines APLF et aprataxine est aussi dépendant de CK2 (Clements et al., 2004a; Iles et al., 2007). Les phosphorylations de XRCC1 par CK2 qui sont responsables de l'interaction avec l'aprataxine ne sont pas stimulées en réponse aux dommages induits par le MMS, ce qui suggère l'existence d'un complexe protéique préexistant (Luo et al., 2004). Ceci est consistant avec l'observation que l'activité cellulaire de CK2 serait constitutive (Litchfield, 2003). Cette interaction pourrait stabiliser la protéine XRCC1 dont le niveau d'expression est fortement réduit en absence de l'aprataxine (Luo et al., 2004). Ceci pourrait expliquer pourquoi la phosphorylation de l'interdomaine 2 de XRCC1 par CK2 semble être impliquée dans le maintien de sa stabilité, XRCC1 étant modifié par ubiquinylation puis dégradé en absence de CK2 (Parsons et al., 2010; Wei et al., 2013). En compilant ces informations, il est possible de proposer que la modification de XRCC1 par CK2 stimule l'interaction de XRCC1 avec l'aprataxine qui pourrait alors inhiber l'ubiquitinylation de XRCC1. De façon intéressante, la surexpression exogène de XRCC1 améliore la viabilité des cellules déficientes pour l'aprataxine en réponse aux dommages de l'ADN induits par un agent alkylant (Luo et al., 2004). L'ensemble des résultats suggère que les phosphorylations de XRCC1 par CK2 sont constitutives, et que d'une part elles stabilisent la protéine XRCC1 cytoplasmique, alors que d'autre part elles permettent un pré-assemblage des complexes de réparation.

Au par ailleurs, l'analyse des études de phospho-protéomiques suggère que les acides aminés 198, 199, 211, 226, 241, 257, 259 ou 266 présents au sein de l'interdomaine 1 de XRCC1 sont phosphorylés de façon constitutive *in vivo* (phospho.elm.eu.org, accession number P18887). L'étude de la séquence de XRCC1 révèle que ces sites phosphorylés sont contenus dans des sites

minimaux consensus de phosphorylation par les CDKs (SP/TP sites : Sérine-Proline / Thréonine-Proline). La présence de XRCC1 au sein d'un complexe protéique contenant la cycline A et une étude suggérant que l'interdomaine 1 de XRCC1 est phosphorylé par la kinase Cdk2 *in vivo* (Chi et al., 2008; Parlanti et al., 2007), suggèrent que ces sites pourraient être phosphorylé par les CDKs *in vivo*. Nous avons donc souhaité déterminer si la région contenant l'interdomaine 1 de XRCC1 était phosphorylée *in vivo*.

Résultats

L'étude des phosphorylations de l'interdomaine 1 de XRCC1 a abouti à la rédaction d'un article de recherche qui est actuellement soumis à DNA Repair. Les principaux résultats de cet article sont présentés ci-dessous :

- **XRCC1 peut être phosphorylé *in vitro* par CDK1, CDK2 et majoritairement par CDK5 au sein de la région interdomaine 1-BRCT1.**

- **Les sites de phosphorylation de CDK5 identifiés *in vitro* sont phosphorylés *in vivo* et déphosphorylés en réponse aux dommages de l'ADN induit par le MMS.**

- **La forme non phosphorylée de XRCC1 est recrutée de façon accrue aux sites de dommages de l'ADN induits par micro-irradiation laser ou par le MMS.**

- **La forme non phosphorylée de XRCC1 présente une affinité significativement supérieure pour les PAR synthétisés par PARP1 et PARP2.**

L'ensemble de ces données nous permet de proposer un modèle suggérant que la protéine XRCC1 est phosphorylée de façon constitutive par CDK5, et déphosphorylée en réponse aux dommages de l'ADN. Cette déphosphorylation augmente l'affinité de XRCC1 pour les PAR, permettant d'accroitre la mobilisation de XRCC1 à la chromatine.

The dephosphorylation of the scaffolding protein XRCC1 in response to DNA damage regulates its BRCT1-dependent recruitment to DNA damage sites

Alexis Fouquin[1,2,5], Bérangère Lombard[3], Jo-Ann Nettersheim[1], Mohammed-Tayyib Boudra[1,2], Damarys Loew[3], Janet Hall[1,5], Vincent Pennaneach[1,5,6]

[1] Institut Curie, PSL Research University, Inserm, U612, Génotoxicologie, Signalisation et Radiothérapie Expérimentale, Centre de Recherche, F-91405 Orsay, France

[2] Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, UMR 3348, F-91405 Orsay, France

[3] Institut Curie, PSL Research University, Laboratoire Spectrométrie de Masse Protéomique, F-75005 Paris, France

[4] Present address: Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM, CNRS, UMR 1052-5286, F-69424 Lyon, France

[5] Present address: Institut Curie, PSL Research University, UMR 3348, Unite Stress Genotoxiques et Cancer, F-91405 Orsay, France

[6] To whom correspondence should be addressed: Vincent Pennaneach, Institut Curie, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay Cedex, France, Tel.: +33 (0)169863105; Fax: +33 (0)169075327; Email: vincent.pennaneach@curie.fr

Running title: XRCC1 phosphorylation regulates the BRCT1 domain functions.

Key words: XRCC1, cyclin-dependent Kinase (Cdk), DNA damage response, dephosphorylation, Poly(ADP-ribose) (PAR).

Highlights:

• Identification of constitutively phosphorylated sites in XRCC1-Linker1 region *in vivo*

• The Linker1 region is dephosphorylated after DNA damage *in vivo*

• The dephosphorylated XRCC1 has increased affinity for damaged DNA

• The Linker1 dephosphorylation increases the XRCC1-BRCT1 binding to Poly(ADP-ribose)

ABSTRACT

Post-translational modifications modulate protein function responses to DNA damage. X-ray repair cross-complementation group 1 (XRCC1) is a scaffolding protein with no enzymatic activity that is central to the assembly of enzymes involved in the repair of

damaged DNA bases and single strand breaks. XRCC1 phosphorylation status regulates its stability and interaction with DNA repair proteins. Here we identified the amino acids in the unstructured XRCC1-Linker1 region that are phosphorylated by Cyclin dependent kinases (Cdks) *in vitro*. We show that *in vivo* the Linker1 region is constitutively phosphorylated and is dephosphorylated after methyl methanesulfonate (MMS) treatment. We show that *in vitro* the phosphorylation of the Linker1 region lowers the affinity of the XRCC1-BRCT1 domain for (ADP-ribose) polymers (PAR). and *in vivo* the BRCT1-dependent recruitment of XRCC1 to damaged chromatin increases when the Linker1 is not phosphorylated. Based on these results we propose that the dephosphorylation in the XRCC1-Linker1 region after MMS treatment increases the affinity of the XRCC1-BRCT1 domain for PAR, stimulating the PARP/PAR-dependent response.

1. Introduction

The interaction of deoxyribonucleotides (DNA) with endogenous reactive species, as well as via exposure to exogenous agents, can result in base damage and single strand breaks (SSBs). The majority of damaged bases are removed and replaced through the base excision repair (BER) pathway. This involves the removal of the damaged base by DNA glycosylases, a family of enzymes specialized in lesion recognition. Base damage can lead to mutations by mispairing, while defects in SSB repair (SSBR) is associated with chromosome instability, cancer development and neurodegeneration [1, 2]. The X-ray cross-complementing group 1 (XRCC1) protein has no enzymatic activity *per se* but plays a central function in coordinating the recruitment and in regulating the activity of enzymes involved in BER and SSBR [3, 4]. Evidence from mouse studies suggests a role for XRCC1 in the genesis of specific cerebellar interneurons and in hippocampal functions [5], while epidemiological studies in humans have reported that the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *Xrcc1* with increased cancer susceptibility depends on the cancer site and demographics of the study population [6].

The XRCC1 protein consists of three structured domains, the N-terminal domain (NTD), the central BRCT1 and the C-terminal BRCT2 domains which are connected by two unstructured linker segments. Linker1 connects the NTD and BRCT1 domains and Linker2 connects the BRCT1 and BRCT2 domains [4]. Each domain participates in the formation of key enzyme complexes involved in BER and SSBR. DNA strand breaks are rapidly bound by Poly ADP-ribose polymerases (PARPs) stimulating the synthesis of polymers of ADP-ribose (PAR) from the dinucleotide NAD^+ [7, 8]. XRCC1 was one of the first proteins identified to

interact with the PAR-automodified PARP1 [9] *via* the ability of its BRCT1 domain to bind to PAR chains [10-12]. The requirement of PARP1 activity for the formation of XRCC1 nuclear foci induced by DNA damaging agents [13-15] or at laser induced photodamage sites [16-18] point towards a PAR-dependent recruitment of XRCC1 at SSBs. The accumulation of PAR following PARP's activation in response to DNA damage is however transient, as the polymers are rapidly degraded by PARG activity. Therefore, the stabilization of XRCC1 at damage sites is not solely dependent on the short lived PAR but also on XRCC1's interaction with DNA repair enzymes [4] and possibly with the damaged DNA [19]. In addition, evidence suggests that the role of XRCC1 during the early steps of BER is independent of its PARP1/PAR interaction [20, 21].

The network of post-translational modifications generated in response to DNA damage often involves protein phosphorylation as an activation event that is followed by dephosphorylation after DNA repair is completed. This in turn restores cell cycle progression. However, it is becoming clear that the activation of cellular processes that leads to the repair of damaged DNA can also involve the dephosphorylation of proteins [22].

The XRCC1 protein is known to be constitutively phosphorylated *in vivo* with the majority of its verified phosphorylated positions in the Linker2 region. Casein Kinase 2 (CK2) dependent phosphorylation of the XRCC1-Linker2 was shown to be responsible for the stable accumulation of XRCC1 at sites of oxidative DNA damage [23, 24], constituting a binding platform for the FHA domain of the polynucleotide kinase phosphatase (PNKP) [23, 24], aprataxin [24, 25] and the aprataxin and PNKP-like factor (APLF) [26]. The unstructured XRCC1-Linker1 region is probably also highly constitutively phosphorylated *in vivo* (phospho.elm.eu.org, accession number P18887) and the DNA damage response stimulates XRCC1's phosphorylation at T284 in the Linker1 and at S371 in the BRCT1 regions [27, 28]. Phosphorylation on T284 in response to MMS treatment appears to promote XRCC1's interaction with glycosylases and stimulates its recruitment and stability at DNA damage sites [27]. Phosphorylation at S371 in the BRCT1 domain in response to X-ray irradiation contributes to DSB resolution [28]. In addition, intriguing evidence suggests that XRCC1 could be dephosphorylated in response to DNA damage at positions outside of the Linker2 region [29]. For these reasons we sought to further characterize XRCC1's phosphorylation status *in vivo*.

We found that residues in the XRCC1 Linker1 region are phosphorylated *in vivo* and that Cdks can phosphorylate these Linker1 residues *in vitro*. Using quantitative mass spectrometry (MS) based proteomics, we observed that residues in the Linker regions are dephosphorylated in response to MMS treatment. We found that a mutated form of XRCC1 protein that cannot be phosphorylated in the Linker1 has a higher affinity for damaged chromatin and that the phosphorylated Linker1-BRCT1 protein has a reduced affinity for PAR. Our results demonstrate for the first time that XRCC1 dephosphorylation in Linker1 after MMS treatment contributes to its role in the PARP-dependent response to DNA damage.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid constructs

The recombinant human maltose binding protein-tagged (MBP) XRCC1 truncated fragments [30] and the mammalian vector p*XRCC1-WT-eYFP* encoding the C-terminal yellow fluorescent protein (eYFP) tagged full length human XRCC1 [31] were previously described. The mutant proteins XRCC1-9A, XRCC1-10A, XRCC1-11A, XRCC1-T367A and XRCC1-T367D were obtained after site-directed mutagenesis of pXRCC1-WT-eYFP plasmid using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) and verified by sequencing. Bacterial vectors pGEX-2T-*XRCC1-L1B1* and pGEX-2T-*XRCC1-L1B1-11A* encoding N-terminal glutathione S-transferase-tagged XRCC1 Linker1-BRCT1 fragment (aa 184-404) were generated by in frame cloning of the XRCC1 ORF fragment (nt 550-1212) amplified by PCR from the p*XRCC1-WT-eYFP* and the p*XRCC1-11A-eYFP* plasmids.

2.2. Fusion protein purification

The recombinant human XRCC1 truncated proteins were produced in BL21 (E3) bacteria as described [30].

2.3. In vitro Cdk kinase assays

Kinase assays were performed with pre-activated recombinant kinases Cdk5-p35 (14-477), Cdk2-cyclinA (14-448) and Cdk1-cyclinB (14-450) from Millipore. Indicated amounts of MBP or GST fusion proteins were incubated with activated kinase (10 ng) in a 20 µl reaction mixture composed of 8 mM MOPS pH 7, 1 mM EDTA, 10 mM magnesium acetate, 100 µM ATP and 5 µCi (γ-^{32}P)ATP (3000 Ci/mmol; PerkinElmer). After 30 min at 25°C, the reactions were stopped by adding SDS sample buffer and run on 10% SDS-PAGE gels. The gels were

exposed to Phosphor-imaging screen and scanned with a Typhon (GE Healthcare Life Sciences) before Coomassie staining.

2.3. Cell lines and transfections

HeLa cells, human embryonic kidney 293T cells and the *XRCC1* deficient EM9 cell line were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FCS, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. All tissue culture reagents were from ThermoFisher Scientific. The wild type or mutant *XRCC1-eYFP* expression plasmids were introduced into EM9 and HeLa cells by transfection with the JetPRIME reagent following the manufacturer's recommendations. The 293T cells were transfected using DNA/calcium phosphate co-precipitation using standard procedures. EM9 transfected cells were selected in G418 (1.5 mg/ml) supplemented media for 10 to 15 days, then maintained in media containing 0.5 mg/ml G418. For cell survival assays, immunofluorescence and survival assays, the stably transfected EM9 cells were sorted before each experiment for identical fluorescence intensity of the eYFP tagged proteins using a FACSARIA III (BD Biosciences).

2.4. Preparation of cell lysates, immunoblotting and immunoprecipitation

Triton-insoluble fractions were isolated from cells as previously described [32] with slight modifications. Briefly, 48 hours after transfection, the 293T cells were rinsed in cold PBS and harvested by scraping into PBS and 3.5 x 10^6 cells were pelleted by centrifuged (120 g, 5 min). Cells were incubated for 10 min on ice with gentle shaking in 220 µl of buffer A (20 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl2, 10 mM Hepes pH 7, 1 mM EGTA, 0.2% Triton X-100) supplemented with protease inhibitors cocktail 1 (Sigma-Aldrich) and phosphatases inhibitor (10 mM β-Glycero phosphate and 1 mM sodium vanadate). The suspension was centrifuged at 12000 g for 10 min at 4°C and the cellular material soluble in buffer A (soluble fraction) was transferred to a fresh tube. After the removal of buffer A, the pellet was resuspended in 110 µl of buffer B (50 mM Tris–HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 10 mM β-Glycero phosphate and 1 mM sodium vanadate) containing 50 U/ml of the DNase Benzonase (MerkMillipore) and protease inhibitors cocktail 1 (Sigma-Aldrich) and incubated at room temperature for 10 min. The suspension was centrifuged at 12000 g for 10 min at 4°C and the cellular material soluble in buffer B (chromatin bound fraction) was transferred to a clean tube. When indicated the cells were treated with 500 µM MMS for 60 min and/or in the presence of 10 µM of the PARP inhibitor ABT-888 (+PARPi) prior to cell fractionation. Protein content was analyzed by western blot. Alternatively the XRCC1-eYFP proteins were

immunoprecipitated from the soluble or the chromatin bound fraction using the µMACS GFP Isolation Kits (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol. For immunoblotting analysis, the following primary antibodies were used : anti-XRCC1 (33-2-5; Abcam), anti-GFP (rabbit polyclonal from ThermoFisher Scientific; mouse monoclonal from Roche Life Sciences), anti-Polβ (18S; Abcam), anti-Cdk1 (E53; Epitomics), anti-Cdk2 (H-298; Santa Cruz Biothechnology), anti-Cdk4 (C-22; Santa Cruz Biothechnology), anti-Cdk5 (C-8; Santa Cruz Biothechnology), anti-Actin (Ab-5; ThermoFisher Scientific), anti-HP1a (rabbit polyclonal; MerkMillipore), anti-PAR (10H; ENZO Life Science) and, anti-ORC2 (3B7; Medical & Biological Laboratories CO), anti-tubulinα (DM 1A; Sigma-Aldrich).

2.5. Mass Spectrometry analysis

The MBP-L1-B1 XRCC1 protein fragment phosphorylated *in vitro* by Cdk5/p35 kinase or the immunoprecipitated XRCC1-eYFP were separated on SDS–PAGE gels (Invitrogen) and stained with colloidal blue staining (LabSafe GEL Blue™ GBiosciences). Gel slices were excised and proteins were reduced with 10 mM DTT prior to alkylation with 55 mM iodoacetamide. After washing and shrinking the gel pieces with 100% MeCN, in-gel digestion was performed using Elastase (Sigma-Aldrich), Chymotrypsin (Promega), trypsin (Promega) and trypsin/AspN (Promega) overnight in 25 mM NH_4HCO_3 at 30 °C. Peptides were extracted and analyzed by nano-LC-MS/MS using an Ultimate 3000 system (Dionex S.A.) coupled to the LTQ-Orbitrap XL (TermoFisher Scientific) or an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Q-OT-qIT, ThermoFisher Scientific).

In vitro phosphopeptide mapping: the Orbitrap XL was used at a resolution of 100,000 ion count target on the 475-1200 m/z range in the Orbitrap and with CID Top5 or Top10 fragmentation mode in the ion trap. For label-free quantification, we used the Orbitrap Fusion and samples (trypsin/AspN in-gel digested peptides) were loaded on a C18 precolumn (300 µm inner diameter x 5 mm; Dionex) at 20 µl/min in 5% MeCN, 0.1% TFA. After a desalting for 3 min, the precolumn was switched onto the C18 column (75 µm i.d. x 50 cm, packed with C18 PepMap™, 3 µm, 100 Å; LC Packings) equilibrated in solvent A (2% MeCN, 0.1% HCO_2H). Bound peptides were eluted using a 150 min linear gradient (from 5 to 30% (v/v)) of solvent B (80% MeCN, 0.085% HCO_2H) at a 150 nl/min flow rate and an oven temperature of 40°C. We acquired Survey MS scans in the Orbitrap on the 400-1500 m/z range with the resolution set to a value of 240,000 and a 4×10^5 ion count target. Each scan was recalibrated in real time by co-injecting an internal standard from ambient air into the C-trap. Tandem MS was performed by isolation at 1.6 Th with the quadrupole, HCD

fragmentation with normalized collision energy of 35, and rapid scan MS analysis in the ion trap. The MS^2 ion count target was set to 10^4 and the max injection time was 100 ms. Only those precursors with charge state 2–7 were sampled for MS^2. The dynamic exclusion duration was set to 30 s with a 10 ppm tolerance around the selected precursor and its isotopes. The instrument was run in top speed mode with 3 s cycles. Data Analysis: data were acquired using the Xcalibur software (v 3.0.63) and the resulting spectra were interrogated by the Mascot™ Software through Proteome Discoverer (v 1.4, ThermoFicher Scientific) with the in house database containing XRCC1-eYFP fusion protein (UniProt-P18887). Variable modifications were set for carbamidomethyl cysteine, oxidation of methionine, N-terminal acetylation and phosphorylation of serine, threonine and tyrosine. The specificity of trypsin/AspN digestion was set and allowed 5 missed cleavage sites and the mass tolerances in MS and MS/MS to 5 ppm and 0.5 Da, respectively. The resulting Mascot files were further processed by using myProMS (v 3.0, https://myProMS-demo.curie.fr, [33]) where we fixed the false discovery rate for peptides identification to less than 1%. Phosphorylated peptides were validated by combining the phosphoRS information and by manually inspecting the peak assignment. In the case of phosphorylation ambiguity, where the spectra did not permit assignment, all the potential residues were shown. Mass spectrometry raw data set is available upon request.

Label-free quantification: the intensity of each phospho-peptide were determined from four independent experimental repeats. We extracted from the MS survey of nano-LC-MS/MS raw files the ion chromatogram (XIC) signal of the well characterized trypsin/AspN peptide ions using the Xcalibur (manually) or the MassChroQ softwares. XIC areas were integrated in Xcalibur under the QualBrowser interface using the ICIS algorithm and in MassChroQ under myProMS interface using XIC TIC (total ion current). The MS1 peak areas values were normalized by using the signal of all the eYFP peptides from XRCC1-eYFP (positions H547 to K881). The Log_2 of the MMS induced fold change in intensity of each phospho-peptide (referred as the Log_2 (MMS/untreated) ratio) and the 95% confidence interval were calculated using a linear model on R software (v. 3.1.0). Each Log_2 (MMS/untreated) is determined from the measurements of four independent experimental repeats. A Welch's two-sided t-test was used to test for mean intensity equality for each phospho-peptide in the MMS treated and untreated conditions, a p value ≤ 0.05 were reported as significant.

2.6. Survival assay

For cell survival assays, 10^3 EM9 sorted cells stably expressing eYFP proteins were plated in 96 well plates in triplicate, and the cells were grown for 24 hours in 100 µl of tissue culture media prior to treatment. After mock treatment or treatment for 1 hour in fresh tissue culture media with increasing concentration of MMS cells were washed three times with culture media and incubated for 5 days under standard growth conditions. Cell viability was determined using the CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Briefly, 20 µl of the CellTiter solution was added to each well. After 60 min incubation at 37°C the absorbance at 490 nm was measured with a microplate reader (BMG Labtech). The absorbance level in untreated cells was defined as 100% of survival, the % of surviving fraction was defined as (absorbance treated cells / absorbance untreated cells × 100). Calculations for survival curves fitting were made through non-linear regression with two-phase decay model using Prism (GraphPad software). The lethal concentration 50% (LC_{50}) defined as the MMS concentration resulting in a viability loss of 50% in the cultures was manually extracted from the survival curves.

2.7. Live-cell videomicroscopy, photodamage and photobleaching

The cells were grown on µDish 35 mm (ibidi®) and transfected with the eYFP fusion protein expression plasmid 48 hours prior to imaging. The recruitment and the real-time follow-up of the protein of interest was carried out using a Confocal Leica SP5 system attached to a DMI6000 stand using a 63x/1.4 objective at the PICT-IBiSA Imaging facility at Institut Curie's Orsay site. All recordings were made using the appropriate sampling frequency (512 x 512 images, line average of 4 and zooming set to 3). The eYFP protein was excited using a 514 nm Argon-laser line. DNA photodamage was generated using a 405 nm laser line (diode) focused onto a single spot of constant size (176 nm) within the nucleus to generate a point of photodamage. The 405 nm diode power output was measured with a S130C photodiode power sensor using an optical energy meter (Thorlabs Inc). Photodamage were induced by exposing the cells nuclei to the laser beam for 25 ms resulting in measured power output of 15 µW (low dose) or for 500 ms resulting in measured power output of 1.1 mW (high dose) (**Supplementary Figure S2**). Recruitment of the protein of interest was monitored by fluorescence using the same settings as for the pre-damage sequence. Nomarski contrast images were taken in parallel. Images were captured at 2 to 10 s interval. Cell motion during the acquisition was compensated with the StackReg plugin and photodamage kinetics were analyzed under the ImageJ software using an in-house developed macro. Data extraction is a semi-automated process where the user is first invited to draw the site of photodamage

designated as the region of interest (ROI). The background ROI is automatically set to the inverse of the nuclear ROI. Intensity from the photodamage site is corrected for both the observational photobleaching and background, and normalized so that its intensity at start-up equals 1 : corrected intensity = ((ROI intensity(t) - background intensity(t) × ROI area/background area) × nuclear intensity(t)) / (ROI intensity(t0) × nuclear intensity(t0)). Only cells with similar pre-irradiation signal intensities were analyzed. For fluorescence loss in photobleaching (FLIP) analysis, cells were untreated or treated with 500 μM MMS for 60 min before performing FLIP experiments. A circular area of 3 μM in diameter was repeatedly photobleached at 491 nm with the Argon-laser line set to maximum power for 1 s (333 iteration of 3 ms) followed by image acquisition of the fluorescence signal. Each analyzed nuclei were subjected to 60 cycles of this sequence. Data extraction is performed as described above except that the chosen ROI must be distinct from the region targeted for photobleaching, signal intensity of the ROI prior to the first photobleach-acquisition cycle is used for normalization so that the intensity at start-up equals 1: corrected intensity = ((ROI intensity(t) − background intensity(t) × ROI area/background area) × nuclear intensity(t)) / (ROI intensity(t0) × nuclear intensity(t0)).

2.8. Dot blot

The binding between PAR and XRCC1 fragments was assessed as previously described [34] with slight modifications. Briefly, recombinant proteins were incubated with active Cdk5/p35 kinase in the same reaction buffer described in the *in vitro* CDK kinase assay omitting the radiolabelled ATP for 30 min at 25°C. Mock treated and phosphorylated proteins were dot blotted on the nitrocellulose membrane. After air drying the membrane was rehydrated in PBS-T buffer (0.05% Tween 20 in PBS) and incubated in 1 nanoM solution of purified PAR (ENZO Life Science) for 1h at room temperature. The membrane was washed six times with PBS-T buffer and incubated for 1 hour in PBS-T supplemented with 5% milk and was examined by anti-PAR antibody and anti-MBP antibody following standard protocols.

3. RESULTS

3.1. XRCC1-Linker1 region is phosphorylated by Cdks *in vitro*

XRCC1 was identified in a DNA repair macromolecular complex also containing Cyclin A, the activating subunit of several Cdks [35] and shown to be phosphorylated *in vitro* at position S226 by Cdk2-cyclin A [36]. In addition, the XRCC1-Linker1-BRCT1 region

includes several SP/TP sites (data not shown), which correspond to the minimal consensus sequences for sites phosphorylated by Cdks.

In order to test this possibility we carried out *in vitro* kinase reactions using the Linker1-BRCT1 XRCC1 fragment as a substrate for Cdk1-cyclinB, Cdk2-cyclinA and Cdk5-p35 (**Figure 1A)**. Under these experimental conditions the highest levels of phosphorylation were obtained with the Cdk5-p35 kinase. Next we assessed if other regions of the XRCC1 protein could also be phosphorylated by the Cdk5-p35 kinase *in vitro*. The XRCC1 full length protein fused to a maltose-binding (MBP) tag was strongly phosphorylated (**Figure 1B** and **C**), while no phosphorylation of either the MBP-tag (data not shown) or the NTD fragments were detected (**Figure 1B** and **C**). Gel quantification revealed that the NTD-Linker1 and the Linker1-BRCT1 fragments were phosphorylated to a level similar to that of the XRCC1-full length protein while the XRCC1 protein fragments BRCT1 and BRCT1-Linker2-BRCT2 were less phosphorylated (**Figure 1B** and **C)**. These results suggest that Cdk phosphorylation sites in the XRCC1 protein are located between amino acids 183 and 404.

Mapping of the phosphor-residues by MS revealed that positions S226, S241, T257, S266, T281, T284 and T367 in the MBP-XRCC1-Linker1-BRCT1 protein were all unambiguously phosphorylated by Cdk5 *in vitro* and either residue T198 or T199, that could not be discriminated by MS, was also phosphorylated (**Figure 1D, Supplementary Table S1** and **Figure S1**). We generated a GST tagged variant of the Linker1 and BRCT1 fragment in which 11 serines and threonines were mutated to alanine at positions T198, T199, S226, S241, T257, S266, T281, T284 and T367 and at positions S259 and S268 that are in close proximity to phosphorylated positions and are predicted to be phosphorylated (phospho.elm.eu.org, accession number P18887). As expected this GST-Linker1-BRCT1-11A mutant protein was no longer a Cdk5 substrate *in vitro* (**Figure 1E**).

3.1. XRCC1-Linker1 region is phosphorylated *in vivo*

To further characterize the profiles of XRCC1 domain phosphorylation *in vivo*, XRCC1-eYFP expressed in 293T cells was immunoprecipitated from soluble and chromatin bound protein extracts and the phosphorylated residues analyzed by MS. We observed that both the soluble and the chromatin bound XRCC1 proteins were constitutively phosphorylated on 18 residues (3 located in NTD, 7 located in Linker1 and 8 located in Linker2) (**Figure 2A** and **Supplementary Table S1 and S2**). Several positions found to be phosphorylated in the Linker2 *in vivo* have previously described to be phosphorylated by CK2 [23, 24]. In addition, most of the Linker1 residues that we identified as phosphorylated *in vitro* by Cdk5 were also

phosphorylated *in vivo*. These results taken together with the observations that several Cdks interact with XRCC1 *in vivo* (see Figure 6A) are consistent with the hypothesis that XRCC1 can be targeted by Cdks *in vivo*. However T367 phosphorylation detected *in vitro* was not found *in vivo* (**Supplementary Table S2**). We next examined which XRCC1 residues were phosphorylated after treatment of cells with MMS. The residues phosphorylated in MMS treated cells were identical to those in untreated cells (**Supplementary Table S2**).

3.2. The Linker1 region is dephosphorylated *in vivo* after treatment with MMS

A label-free MS quantification approach was used to determine the fold change in the peptide phosphorylation intensity in the MMS-treated relative to the untreated cells. The 21 peptides sufficiently abundant from the soluble and the chromatin bound XRCC1 for this quantitative analysis encompass 15 phosphorylated residues (3 located in NTD, 4 located in Linker1 and 8 located in Linker2) (**Figure 2B** and **Supplementary Table S3**). We observed that a 60 min exposure of cells to MMS is sufficient to induce a significant reduction in the phosphorylation intensity of soluble and chromatin bound XRCC1 peptides. MMS treatment induces a reduction in phosphorylation intensity in the soluble XRCC1 at 4 positions in the Linker1 region and 8 positions in Linker2 region and a reduction in the phosphorylation intensity in the chromatin bound XRCC1 at one position in the NTD and 3 positions in the Linker1 region (**Figure 2B** and **Supplementary Table S3**). T284 previously described to be hyper-phosphorylated *in vivo* in response to MMS [27], was not found to be phosphorylated *in vivo* in our experimental models (**Supplementary Table S2** and **Table S3**). The peptide 275-LPAPTRTPATAPVPAR-290 encompassing positions T281 and T284 was sufficiently abundant to unambiguously demonstrate that T284 is not phosphorylated whilst the phosphorylation intensity at position T281 is significantly decreased after MMS treatment, thus excluding a detection sensitivity issue in our experimental models. We currently have no explanation for the discrepancy between our observations and the previously reported hyperphosphorylation after MMS treatment at T284 [27].

3.4. Linker region phosphorylation is not critical for cell viability

Based on our robust *in vivo* data that the XRCC1 protein is highly dephosphorylated as an early response to MMS treatment, we next investigated the impact of phosphorylation in the XRCC1 Linker1 and BRCT1 regions on MMS induced cell killing (**Figure 3**). We compared the sensitivity of the *XRCC1* defective EM9 cells stably complemented either with wild-type

full length XRCC1 (XRCC1-WT) or with the XRCC1 phospho-mutant XRCC1-10A (T198A, T199A, S226A, S241A, T257A, S259A, S266A, S268A, T281A, T284A) that lacks the Cdk phosphorylation sites in the Linker1 region (**Figure 3A**). As expected, the MMS hypersensitivity of EM9-*XRCC1* defective cells transfected with the empty vector (EM9-vector) (lethal concentration, 50%; LC_{50} = 0.103 mM), was complemented by the expression of XRCC1-WT (LC_{50} = 0.631 mM, $p < 0.001$) (**Figure 3B** and **C**). The XRCC1-10A phospho-mutant (LC_{50} = 0.453 mM) and the XRCC1-9A phospho-mutant (identical to the XRCC1-10A mutant except at position 284 where the alanine was reverted to threonine) (LC_{50} = 0.529 mM) equally complemented the MMS sensitivity of the EM9 cells as did the XRCC1-WT protein ($p = 0.07$ and $p = 0.24$, respectively). These observations show that XRCC1 can promote cell survival after the induction of DNA damage when the Linker1 region unsphorylated, or when the Linker2 region unphosphorylated [23, 24, 37].

We also analyzed the effect of the T367A mutation in the context of the Linker1 phospho-mutations in the XRCC1-11A proteins. The T367A mutant and the XRCC1-11A mutant showed an identical response with a lower LC_{50} (LC_{50} = 0.230 mM and LC_{50} = 0.201 mM respectively) compared to XRCC1-WT cells ($p = 0.01$) (**Figure 3B** and **C**). In addition, the MMS sensitivity of the EM9 cells expressing the phospho-mimetic mutant XRCC1-T367D (LC_{50} = 0.106 mM) was identical to that of cells transfected with the empty vector (LC_{50} = 0.103 mM, $p = 0.8$) or those expressing the deficient mutant XRCC1-L360D (LC_{50} = 0.1 mM, $p = 0.7$) [14, 15, 38]. Although threonine at position 367 in the BRCT1 domain was not observed to be phosphorylated *in vivo*, this residu is critical for XRCC1's functions in cell survival.

3.5. The XRCC1 protein that cannot be phosphorylated in the Linker1 region has an increased affinity for chromatin

To examine the possibility that Linker1 and BRCT1 phosphorylation may regulate the sub-cellular distribution of the XRCC1 protein, 293T cells expressing wild type or mutant XRCC1 proteins were fractionated with Triton X-100-containing buffers [29, 32] followed by the measurement of the XRCC1-eYFP protein levels in the soluble and chromatin bound fraction by western blot (**Figure 4A** and **B**). All the XRCC1 proteins could be retained to a certain degree on the chromatin whith each mutant presenting distinct affinity profiles compared to the wild type XRCC1 protein. The abundance of the XRCC1-9A and the -10A mutants in the chromatin bound fraction is 15-20% higher than the XRCC1-WT ($p = 0.01$)

(**Figure 4A** and **B**). In contrast, proteins with mutations within the BRCT1 domain, the XRCC1-T367A or the XRCC1-T367D and the XRCC1-11A protein, are associated with a 50% reduction in the amount of XRCC1 protein in the chromatin bound fraction ($p = 0.004$).

The XRCC1 protein is known to be readily recruited to sites of DNA damage in cells treated by MMS [31, 39]. We compared the formation of XRCC1 foci in EM9 cells complemented with the wild type XRCC1 (XRCC1-WT) or the XRCC1-9A or XRCC1-T367D mutants proteins (**Figures 4C** and **D**). The proportion of untreated cells with XRCC1-eYFP foci was significantly higher in EM9-XRCC1-9A complemented cells than in EM9-XRCC1-WT complemented cells (26% and 8.8% respectively; $p < 0.0001$), and only 0.75% of the EM9-XRCC1-T367D complemented cells were foci-positive (**Figure 4D**). Treatment with MMS increased the proportion of XRCC1 foci-positive nuclei in all three cell lines ($p < 0.0001$). In addition, after MMS treatment the proportion of cells with XRCC1 foci was significantly higher in EM9-XRCC1-9A complemented cells than in EM9-XRCC1-WT complemented cells (51% and 24.5% respectively; $p < 0.0001$). EM9 cells complemented with XRCC1-T367D had the lowest proportion of foci-positive cells after MMS treatment (7.1%) (**Figure 4D**). The proportion of EM9-XRCC1-WT complemented cells with XRCC1 foci increased by 2.8 fold after MMS treatment ($p < 0.0001$), whereas the MMS treatment induced a two fold increase of the proportion of cells with foci in EM9-XRCC1-9A complemented cells ($p < 0.0001$) (**Figure 4D**). These observations indicate that the affinity of the XRCC1 protein for chromatin increases when the Linker1 is not phosphorylated, and this independently of the cells treatment with MMS. The dephosphorylation of the XRCC1 Linker1 domain in response to DNA damage appears to increase the affinity of XRCC1 for the damaged chromatin.

We next examined if the recruitment of XRCC1 to sites of UV laser induced localized DNA damage in the nucleus of HeLa cells is impacted when the Linker1 region cannot be phosphorylated. It should be noted that all XRCC1 wild type and mutant proteins are exclusively located in the cells nucleus (for EM9 cells see Figure 4C and D and for HeLa cells see Figure 5), showing that unlike previously speculated [40], the phosphorylation status of XRCC1s' nuclear localization signal at residus T257 and S266 have no detectable impact on it's presence in the cells nuclei. The XRCC1-WT and the phospho-mutant XRCC1-9A and XRCC1-10A eYFP tagged proteins show transient accumulation at DNA damage sites generated by UV laser micro-irradiation (**Figure 5A**). The apparent accumulation of the XRCC1-9A and XRCC1-10A reached a maximum relative intensity that is significantly higher ($p < 10^{-5}$) than for the XRCC1-WT (maximum relative intensity of XRCC1-WT 2.34 ±

0.1 at 104 s, XRCC1-9A 3.04 ± 0.13 at 124 s, and XRCC1-10A 3.19 ± 0.15 at 144 s) (**Figure 5A**). These observations confirm that the affinity of the XRCC1 protein for the DNA damage sites increases when the Linker1 region is not phosphorylated.

We also analyzed the effect of the T367A mutation in the context of the Linker1 phospho-mutations in the XRCC1-11A proteins. The XRCC1-T367A mutant was weakly recruited followed by a rapid dissociation from damaged sites generated by micro-irradiation of nuclei (maximum intensity is 1.34 ± 0.14 at 34 s) (**Figure 5A**) and both the XRCC1-T367A and XRCC1-11A proteins have similar recruitment profiles (**Figure 5A**). Because damages generated by low doses of UV laser irradiation (see material and methods and **Supplementary Figures S2**) were not sufficient to induce the recruitment of the XRCC1-T367D mutant (Data not shown), we analysed the recruitment of this at DNA damages sites generated by high doses of UV (**Supplementary Figures S2** and **S3)**. The mutation T367D, like mutations in the BRCT1 domain of the amino acids L360 and K369 that are essential for the binding of XRCC1 to PAR [10, 12, 14, 15, 38], greatly impedes the recruitment of the XRCC1 at DNA damages are induced by high doses of UV (**Supplementary Figure S3)**. These observations suggest that the T367 is probably a structural component of the BRCT1 phospho-binding pocket that contributes to the PAR-dependent.

To test whether the phosphorylation of the Linker1 domain affects the mobility of XRCC1 from the damaged chromatin, we performed focal fluorescence loss in photobleaching (FLIP) experiments in MMS treated or untreated HeLa cells expressing the XRCC1 WT or the XRCC1-9A phospho-mutant. The time required for photobleaching 75% of the total XRCC1-WT-eYFP or XRCC1-9A-eYFP molecules is the same in non-treated cells (30.3 s compared to 31.9 s; $p = 0.28$), and the time increase after MMS treatment is identical for both proteins (39.2 s compared to 40.3 s; $p = 0.1$) (**Figure 5C**). The analysis of XRCC1 recruitment and mobility suggests that the phosphorylation status of the Linker1 domain only affects the recruitment of XRCC1 and not its dissociation from the damaged DNA.

Taken together, these results suggest that in response to DNA damage, the XRCC1 Linker1 domain is dephosphorylated, which increases the PAR-dependent recruitment of XRCC1 to damaged chromatin.

3.6. The Linker1 region phosphorylation modulates the PAR affinity of the XRCC1-BRCT1 region

We next explored if the Linker1 phosphorylation could affect the interaction of XRCC1 with the PARP1 protein and with the PAR.

The abundance of the XRCC1-9A mutant in the chromatin bound fraction is higher than the abundance of the XRCC1-WT, in untreated cells and in MMS treated cells (**Figures 4B** and **6A**). We observed that treating the cells with MMS increased the abundance of the chromatin bound XRCC1-9A and XRCC1-WT mutant, whilst the addition of the PARP inhibitor Veliparib during the MMS treatment lead to a reduction in the abundance in the chromatin bound fraction of both the XRCC1-9A and XRCC1-WT mutant (**Figures 6A** and **6B**). The level of the XRCC1-T367D protein in the chromatin fraction was lower than the level of XRCC1-9A or XRCC1-WT proteins in all tested conditions (**Figures 6A** and **B**). Using an immunoprecipitation approach, we found that the XRCC1-9A mutant, which cannot be phosphorylated on the Linker1, has a higher affinity for endogenous PARP1 than the XRCC1-WT protein, in both MMS treated and untreated cells (**Figure 6C**). These results along with our observations that the recruitment of the XRCC1-9A mutant at UV-laser induced damaged sites (**Supplementary Figures S2** and **S3**) or at the MMS-induced damaged chromatin is greatly dependent on PAR synthesized, suggest that the phosphorylation of the XRCC1-Linker1 region could modulate the PAR affinity of the XRCC1-BRCT1 region.

We also explored if the mutations in the XRCC1-9A or the XRCC1-T367D mutant proteins could affect the interaction of XRCC1 proteins with other DNA repair components *in vivo*. The XRCC1-WT, XRCC1-9A and XRCC1-T367D proteins bind DNA polymerase β and DNA ligase 3 to the same extent (**Figure 6D**). In addition, they equally bind Cdk1 and Cdk2 (**Figure 6D**) as well as Cdk4 and Cdk5 (data not shown) kinases, suggesting that *in vivo* several Cdks could phosphorylate XRCC1.

We tested *in vitro* if the phosphorylation of the XRCC1-Linker1 region could modulate the PAR affinity of the XRCC1-BRCT1 region. For this, the MBP-NTD, MBP-Linker1-BRCT1 and MBP-BRCT1 recombinant proteins were spotted onto nitrocellulose membranes, and their ability to bind PAR was assessed. As expected, both the Linker1-BRCT1 and the BRCT1 fragments, but not the NTD fragment of XRCC1, can bind PAR (**Figure 6E**). No difference in PAR binding between the Cdk-phosphorylated BRCT1 domain and non-phosphorylated BRCT1 domains was found ($p = 0.9$) (**Figure 6E** and **F**). However, the capacity of the Cdk-phosphorylated Linker1-BRCT1 fragment to bind PAR was reduced by 50% compared to the non-phosphorylated fragment ($p = 0.015$) (**Figure 6E** and **F**). These observations show that the affinity of the BRCT1 domain for PAR is reduced when the Linker1 region is phosphorylated.

The results presented here show that the constitutively phosphorylated XRCC1-Linker1 region is dephosphorylated in response of cells treatment with the alkylating agent MMS. The unphosphorylated Linker1 increases the affinity of the BRCT1 domain for damaged chromatin, PARP1 and PAR. Taken together these observation suggest that the dephosphorylation of the XRCC1-Linker1 region in response to a genotoxic stress which increases the affinity of the XRCC1-BRCT1 domain to PARP and PAR, hence promoting the recruitment of XRCC1 at the damaged chromatin.

4. Discussion

We have established that the XRCC1 protein is constitutively phosphorylated at 7 positions in the Linker1 *in vivo* (S210, S215, S226, S241, S256, S266 and S281) and our results suggest that 4 of these phosphorylations could be dependent on Cdks to which XRCC1 can bind *in vivo*. However, we cannot formally exclude that other kinases can phosphorylate these positions in the XRCC1-Linker1 region *in vivo*. Indeed, it has been have observed that in HeLa cells, XRCC1 could be phosphorylated in response to EGF treatment by the ERK1/2 and p38α/β-MAPK kinases in the Linker1 region at positions S241, S266 and S268 [41, 42]. In addition, our MS analysis confirms previous publications [23, 24] showing that the Linker2 region of XRCC1 is also constitutively phosphorylated on at least 13 residues.

It was shown that the constitutively phosphorylated Linker2 residues S518/T519/T523 remained phosphorylated after MMS [24]. Furthermore XRCC1 needs to be constitutively phosphorylated on the eight CK2 consensus sites in the Linker2 region to interact with PNKP [23, 43], to facilitates XRCC1 accumulation [23] and the dissociation [37, 44] of from the damaged chromatin. These data show that the constitutive phosphorylation of the XRCC1 Linker2 is required to stimulate DNA repair [23].

We found that MMS treatment results in the dephosphorylation of the soluble XRCC1 region at 5 Linker1 residues and at 7 Linker2 residus. In addition we found that the chromatin bound XRCC1 is dephosphorylated at 3 Linker1 residues after MMS. Also, we show that when the Linker1 region is dephosphorylated it increases the XRCC1 affinity for damaged chromatin, for the PARP1 protein and enhances the BRCT1-dependent affinity for PAR. Our observations suggest that the dephosphorylation of the Linker1 in response to DNA damage is required to enhance the XRCC1 recruitment at DNA damage sites and possibly its functions in response to DNA damage.

In spite of this, neither the phosphorylation status of the Linker1 region (our results) nor of

the Linker2 region [23, 24, 37] are major determinants of cell survival after induced DNA damage. A possible explanation is that the recruitment of XRCC1 mutants that cannot be phosphorylated in the Linker1 region or in the Linker2 region at sites of DNA damage, albeit with different kinetics compared to the XRCC1 wild type protein, is sufficient to ensure DNA repair which in turn promotes cell survival.

The XRCC1-BRCT1 domain is essential for promoting PAR-binding and PAR-dependent recruitment of XRCC1 at DNA damage sites [10, 12, 15, 45]. Our results show that the phosphorylation of the XRCC1-Linker1 region decreases the affinity of the XRCC1-BRCT1 domain for PAR and impedes the PAR-dependent accumulation of XRCC1 at DNA damage sites *in vivo*. Recently the BRCT1 residue K369 was shown to interact with phosphate group in ADP-ribose [10, 46] and the PAR-binding pocket within the BRCT1 domain was found to have structural homology with the phosphopeptide recognition domain FHA [12]. We propose that the threonine in position 367 of the XRCC1-BRCT1 domain is an important structural residu of the PAR/phospho-binding pocket required for the recruitment of XRRC1 at DNA damage sites.

We propose that the constitutive phosphorylation of unstructured Linker1 region on serines/threonines could bind to the PAR-binding pocket in the BRCT1 domain. The masking of the BRCT1 domain by phosphate moieties in the Linker1 would lower the XRCC1 affinity for PAR under unchallenged growth conditions where PARP activity is mostly required for processes other than DNA repair [47]. Alternatively, repulsion between the negatively charged PAR and the negative charges of the constitutively phosphorylated Linker1 region could lower the affinity of XRCC1 for PAR. The dephosphorylation of Linker1 in response to MMS would no longer mask the BRCT1 PAR-binding pocket and the BRCT1 domain could now efficiently bind to PAR. The dephosphorylation of the Linker1 region and the extensive activation of PARP will both contribute to the rapid recruitment of XRCC1 to PAR-tagged DNA damage sites.

Based on these observations, XRCC1 should be added to the growing list of proteins whose dephosphorylation regulates the DNA damage response [22, 48]. Our findings underline that the functions of this scaffolding protein in response to DNA damage can be regulated by a very dynamic intricate network of post-translational modifications probably involving multiple kinases and phosphatases. It will be intriguing to consider how these

phosphorylation/dephosphorylation-regulatory loops affect the function of XRCC1 variant proteins that have been associated with the risk of developing certain cancers and adverse reactions to radiotherapy.

Aknowledgements

We thank Marie-Noëlle Soler for the measurements of the Power output of the 405 nm diode for UV induced photodamage and Alexandre Sta for the proteomic statistical analyses.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest for this article.

Author contributions

AF generated and analysed the video-microscopy experiments, MTP provided preliminary observations at an early stage of the study, VP conducted the *in vitro* phosphorylation and the immunoprecipitation experiments, BL and DL carried out mass spectrometry data gathering and analysis, JAN performed the cell survival experiments, VP and AF designed the experiments, VP, AF, DL and JH wrote the manuscript.

Supplementary data

Supplementary data are available at DNA repair Online.

Fundings

The authors greatly acknowledge the PICT-IBiSA@Orsay Imaging Facility of the Institut Curie supported by the French National Research Agency through the “Investissment for the future” program (France-BioImaging, ANR-10-INSB-04). Research in Inserm U612 was supported by funding from Institut Curie and Inserm. This work was financially supported by “Fondation-EDF” grants (RB2013-18 and RB2014-09) (to VP), and the “Région Ile-de-France” and “Fondation pour la Recherche Médicale” (DGE 20121125630) grants (to D.L.). The Ministry of Education and the Association pour la Recherche sur le Cancer for PhD grants (AF) and the Institute Curie International Postdoctoral fellow program grant (MTB) are acknowledged.

References

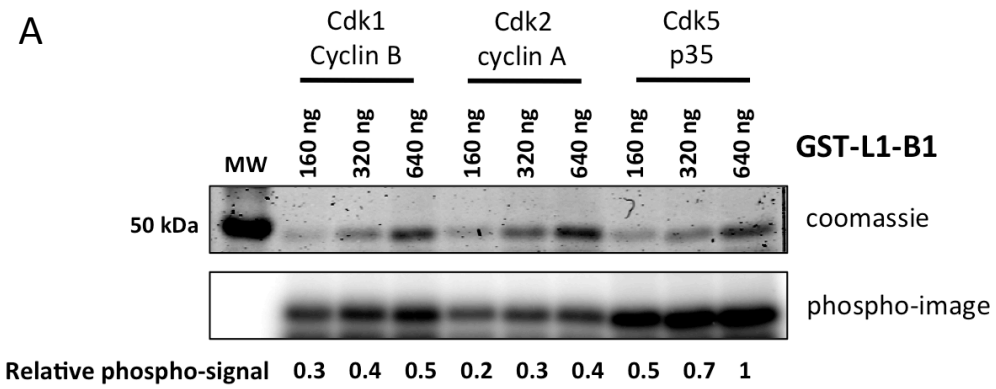
[1] R. Madabhushi, L. Pan, L.H. Tsai, DNA damage and its links to neurodegeneration, Neuron, 83 (2014) 266-282.
[2] P.J. McKinnon, K.W. Caldecott, DNA strand break repair and human genetic disease, Annual review of genomics and human genetics, 8 (2007) 37-55.
[3] A. Hanssen-Bauer, K. Solvang-Garten, M. Akbari, M. Otterlei, X-ray repair cross complementing protein 1 in base excision repair, International journal of molecular sciences, 13 (2012) 17210-17229.
[4] R.E. London, The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair, DNA repair, 30 (2015) 90-103.
[5] Y. Lee, S. Katyal, Y. Li, S.F. El-Khamisy, H.R. Russell, K.W. Caldecott, P.J. McKinnon, The genesis of cerebellar interneurons and the prevention of neural DNA damage require XRCC1, Nature neuroscience, 12 (2009) 973-980.
[6] B. Karahalil, V.A. Bohr, D.M. Wilson, 3rd, Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk, Human & experimental toxicology, 31 (2012) 981-1005.
[7] S.B. De Lorenzo, A.G. Patel, R.M. Hurley, S.H. Kaufmann, The Elephant and the Blind Men: Making Sense of PARP Inhibitors in Homologous Recombination Deficient Tumor Cells, Frontiers in oncology, 3 (2013) 228.
[8] M. De Vos, V. Schreiber, F. Dantzer, The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art, Biochemical pharmacology, 84 (2012) 137-146.
[9] M. Masson, C. Niedergang, V. Schreiber, S. Muller, J. Menissier-de Murcia, G. de Murcia, XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage, Molecular and cellular biology, 18 (1998) 3563-3571.
[10] C. Breslin, P. Hornyak, A. Ridley, S.L. Rulten, H. Hanzlikova, A.W. Oliver, K.W. Caldecott, The XRCC1 phosphate-binding pocket binds poly (ADP-ribose) and is required for XRCC1 function, Nucleic acids research, 43 (2015) 6934-6944.
[11] I.K. Kim, R.A. Stegeman, C.A. Brosey, T. Ellenberger, A quantitative assay reveals ligand specificity of the DNA scaffold repair protein XRCC1 and efficient disassembly of complexes of XRCC1 and the poly(ADP-ribose) polymerase 1 by poly(ADP-ribose) glycohydrolase, The Journal of biological chemistry, 290 (2015) 3775-3783.
[12] M. Li, L.Y. Lu, C.Y. Yang, S. Wang, X. Yu, The FHA and BRCT domains recognize ADP-ribosylation during DNA damage response, Genes & development, 27 (2013) 1752-1768.
[13] K.W. Caldecott, XRCC1 and DNA strand break repair, DNA repair, 2 (2003) 955-969.
[14] S.F. El-Khamisy, M. Masutani, H. Suzuki, K.W. Caldecott, A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage, Nucleic acids research, 31 (2003) 5526-5533.
[15] S. Okano, L. Lan, K.W. Caldecott, T. Mori, A. Yasui, Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells, Molecular and cellular biology, 23 (2003) 3974-3981.
[16] C. Godon, F.P. Cordelieres, D. Biard, N. Giocanti, F. Megnin-Chanet, J. Hall, V. Favaudon, PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility, Nucleic acids research, 36 (2008) 4454-4464.
[17] L. Lan, S. Nakajima, Y. Oohata, M. Takao, S. Okano, M. Masutani, S.H. Wilson, A. Yasui, In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101 (2004) 13738-13743.

[18] O. Mortusewicz, J.C. Ame, V. Schreiber, H. Leonhardt, Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells, Nucleic acids research, 35 (2007) 7665-7675.
[19] R.S. Mani, F. Karimi-Busheri, M. Fanta, K.W. Caldecott, C.E. Cass, M. Weinfeld, Biophysical characterization of human XRCC1 and its binding to damaged and undamaged DNA, Biochemistry, 43 (2004) 16505-16514.
[20] A. Campalans, T. Kortulewski, R. Amouroux, H. Menoni, W. Vermeulen, J.P. Radicella, Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair, Nucleic acids research, 41 (2013) 3115-3129.
[21] C.E. Strom, F. Johansson, M. Uhlen, C.A. Szigyarto, K. Erixon, T. Helleday, Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate, Nucleic acids research, 39 (2011) 3166-3175.
[22] X.F. Zheng, P. Kalev, D. Chowdhury, Emerging role of protein phosphatases changes the landscape of phospho-signaling in DNA damage response, DNA repair, 32 (2015) 58-65.
[23] J.I. Loizou, S.F. El-Khamisy, A. Zlatanou, D.J. Moore, D.W. Chan, J. Qin, S. Sarno, F. Meggio, L.A. Pinna, K.W. Caldecott, The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks, Cell, 117 (2004) 17-28.
[24] H. Luo, D.W. Chan, T. Yang, M. Rodriguez, B.P. Chen, M. Leng, J.J. Mu, D. Chen, Z. Songyang, Y. Wang, J. Qin, A new XRCC1-containing complex and its role in cellular survival of methyl methanesulfonate treatment, Molecular and cellular biology, 24 (2004) 8356-8365.
[25] P.M. Clements, C. Breslin, E.D. Deeks, P.J. Byrd, L. Ju, P. Bieganowski, C. Brenner, M.C. Moreira, A.M. Taylor, K.W. Caldecott, The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair proteins XRCC1 and XRCC4, DNA repair, 3 (2004) 1493-1502.
[26] S. Kanno, H. Kuzuoka, S. Sasao, Z. Hong, L. Lan, S. Nakajima, A. Yasui, A novel human AP endonuclease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses, The EMBO journal, 26 (2007) 2094-2103.
[27] W.C. Chou, H.C. Wang, F.H. Wong, S.L. Ding, P.E. Wu, S.Y. Shieh, C.Y. Shen, Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair, The EMBO journal, 27 (2008) 3140-3150.
[28] N. Levy, A. Martz, A. Bresson, C. Spenlehauer, G. de Murcia, J. Menissier-de Murcia, XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage, Nucleic acids research, 34 (2006) 32-41.
[29] Y. Kubota, T. Takanami, A. Higashitani, S. Horiuchi, Localization of X-ray cross complementing gene 1 protein in the nuclear matrix is controlled by casein kinase II-dependent phosphorylation in response to oxidative damage, DNA repair, 8 (2009) 953-960.
[30] S. Marsin, A.E. Vidal, M. Sossou, J. Menissier-de Murcia, F. Le Page, S. Boiteux, G. de Murcia, J.P. Radicella, Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1, The Journal of biological chemistry, 278 (2003) 44068-44074.
[31] A. Campalans, S. Marsin, Y. Nakabeppu, R. O'Connor T, S. Boiteux, J.P. Radicella, XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: a model for its recruitment to base excision repair, DNA repair, 4 (2005) 826-835.
[32] C. Le Chalony, F. Hoffschir, L.R. Gauthier, J. Gross, D.S. Biard, F.D. Boussin, V. Pennaneach, Partial complementation of a DNA ligase I deficiency by DNA ligase III and its impact on cell survival and telomere stability in mammalian cells, Cellular and molecular life sciences : CMLS, 69 (2012) 2933-2949.
[33] P. Poullet, S. Carpentier, E. Barillot, myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data, Proteomics, 7 (2007) 2553-2556.

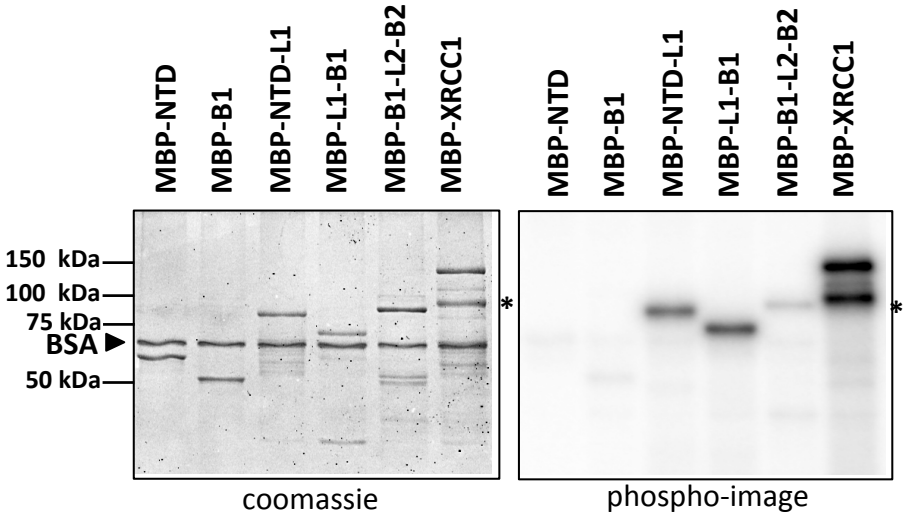
[34] Y. Ji, Noncovalent pADPr Interaction with Proteins and Competition with RNA for Binding to Proteins, in: V.A. Tulin (Ed.) Poly(ADP-ribose) Polymerase: Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 2011, pp. 83-91.
[35] E. Parlanti, G. Locatelli, G. Maga, E. Dogliotti, Human base excision repair complex is physically associated to DNA replication and cell cycle regulatory proteins, Nucleic acids research, 35 (2007) 1569-1577.
[36] Y. Chi, M. Welcker, A.A. Hizli, J.J. Posakony, R. Aebersold, B.E. Clurman, Identification of CDK2 substrates in human cell lysates, Genome biology, 9 (2008) R149.
[37] C.E. Strom, O. Mortusewicz, D. Finch, J.L. Parsons, A. Lagerqvist, F. Johansson, N. Schultz, K. Erixon, G.L. Dianov, T. Helleday, CK2 phosphorylation of XRCC1 facilitates dissociation from DNA and single-strand break formation during base excision repair, DNA repair, 10 (2011) 961-969.
[38] R.M. Taylor, A. Thistlethwaite, K.W. Caldecott, Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair, Molecular and cellular biology, 22 (2002) 2556-2563.
[39] S. Okano, L. Lan, A.E. Tomkinson, A. Yasui, Translocation of XRCC1 and DNA ligase IIIalpha from centrosomes to chromosomes in response to DNA damage in mitotic human cells, Nucleic acids research, 33 (2005) 422-429.
[40] T.W. Kirby, N.R. Gassman, C.E. Smith, L.C. Pedersen, S.A. Gabel, M. Sobhany, S.H. Wilson, R.E. London, Nuclear Localization of the DNA Repair Scaffold XRCC1: Uncovering the Functional Role of a Bipartite NLS, Scientific reports, 5 (2015) 13405.
[41] J.V. Olsen, B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, M. Mann, Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks, Cell, 127 (2006) 635-648.
[42] C. Pan, J.V. Olsen, H. Daub, M. Mann, Global effects of kinase inhibitors on signaling networks revealed by quantitative phosphoproteomics, Molecular & cellular proteomics : MCP, 8 (2009) 2796-2808.
[43] M. Lu, R.S. Mani, F. Karimi-Busheri, M. Fanta, H. Wang, D.W. Litchfeld, M. Weinfeld, Independent mechanisms of stimulation of polynucleotide kinase/phosphatase by phosphorylated and non-phosphorylated XRCC1, Nucleic acids research, 38 (2010) 510-521.
[44] L. Wei, S. Nakajima, C.L. Hsieh, S. Kanno, M. Masutani, A.S. Levine, A. Yasui, L. Lan, Damage response of XRCC1 at sites of DNA single strand breaks is regulated by phosphorylation and ubiquitylation after degradation of poly(ADP-ribose), Journal of cell science, 126 (2013) 4414-4423.
[45] Y. Kubota, S. Horiuchi, Independent roles of XRCC1's two BRCT motifs in recovery from methylation damage, DNA repair, 2 (2003) 407-415.
[46] M. Li, X. Yu, Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation, Cancer cell, 23 (2013) 693-704.
[47] R. Krishnakumar, W.L. Kraus, The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets, Molecular cell, 39 (2010) 8-24.
[48] A.K. Freeman, A.N. Monteiro, Phosphatases in the cellular response to DNA damage, Cell communication and signaling : CCS, 8 (2010) 27.

Figure 1

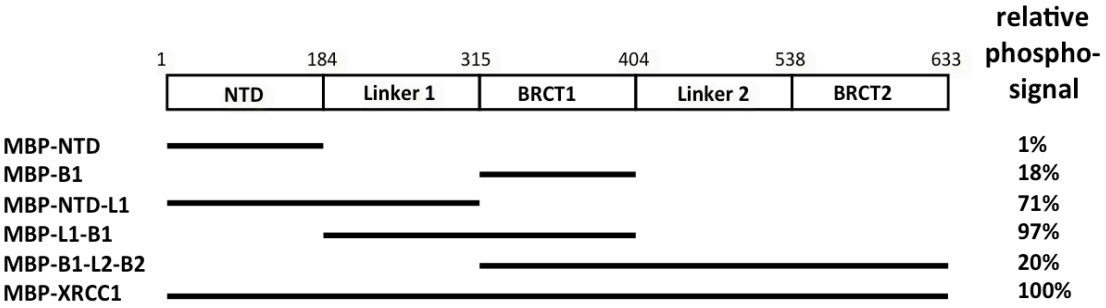
A



B



C



D

Best ion score[1]	Peptide sequence	Precursor ion charge	Phosphosite position	PhosphoRS peptide position validation (%)	Digestion
31,5	^{196}NKTSPVTASDPAGPSYA^{212}	2+	T198 or S199	49.2 for T3 and S4	Elastase
78,9	^{213}AATLQASSAASSASPVSRA^{231}	2+	S226	100	Elastase
53,7	^{231}AIGSTSKPQESPK^{243}	2+	S241	100	Trypsin
25,9	^{249}DLNQEEKKTPSKPPAQL^{265}	2+	T257	98,7	Chymotrypsin
34,9	^{256}KTPSKPPAQLSPSVPK^{271}	2+	S266	99,2	Trypsin
39,4	^{275}LPAPTRTPATAPVPAR^{290}	3+	T281 and T284	100	Trypsin
53,2	^{281}TPATAPVPAR^{290}	2+	T281	100	Trypsin
42,8	^{356}DSTHLICAFANTPK^{369}	2+	T367	100	Trypsin

E

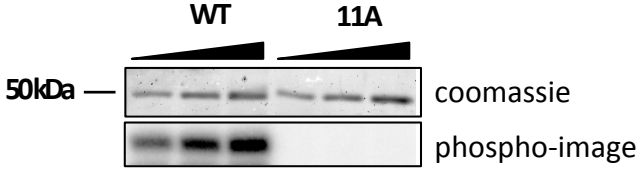
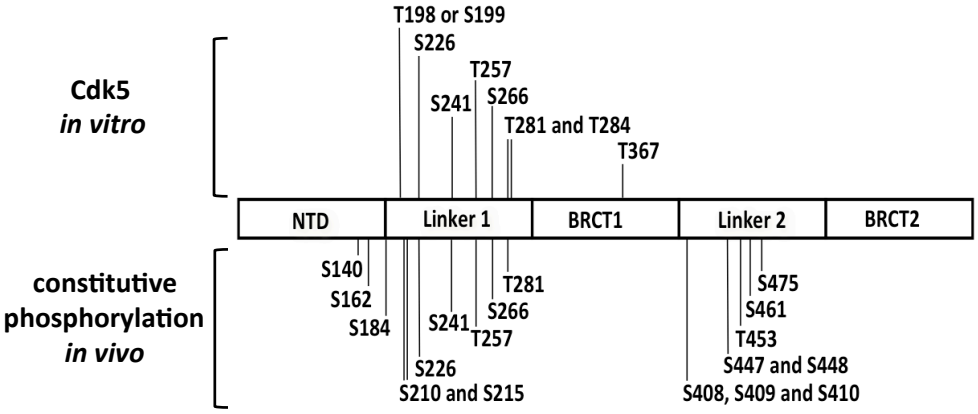


Figure 2

A


Cdk5
in vitro
T198 or S199
S226
T257
S241
S266
T281 and T284
T367
NTD
Linker 1
BRCT1
Linker 2
BRCT2
constitutive
phosphorylation
in vivo
S140
S162
S184
S226
S210 and S215
S241
T257
S266
T281
S475
S461
T453
S447 and S448
S408, S409 and S410

B

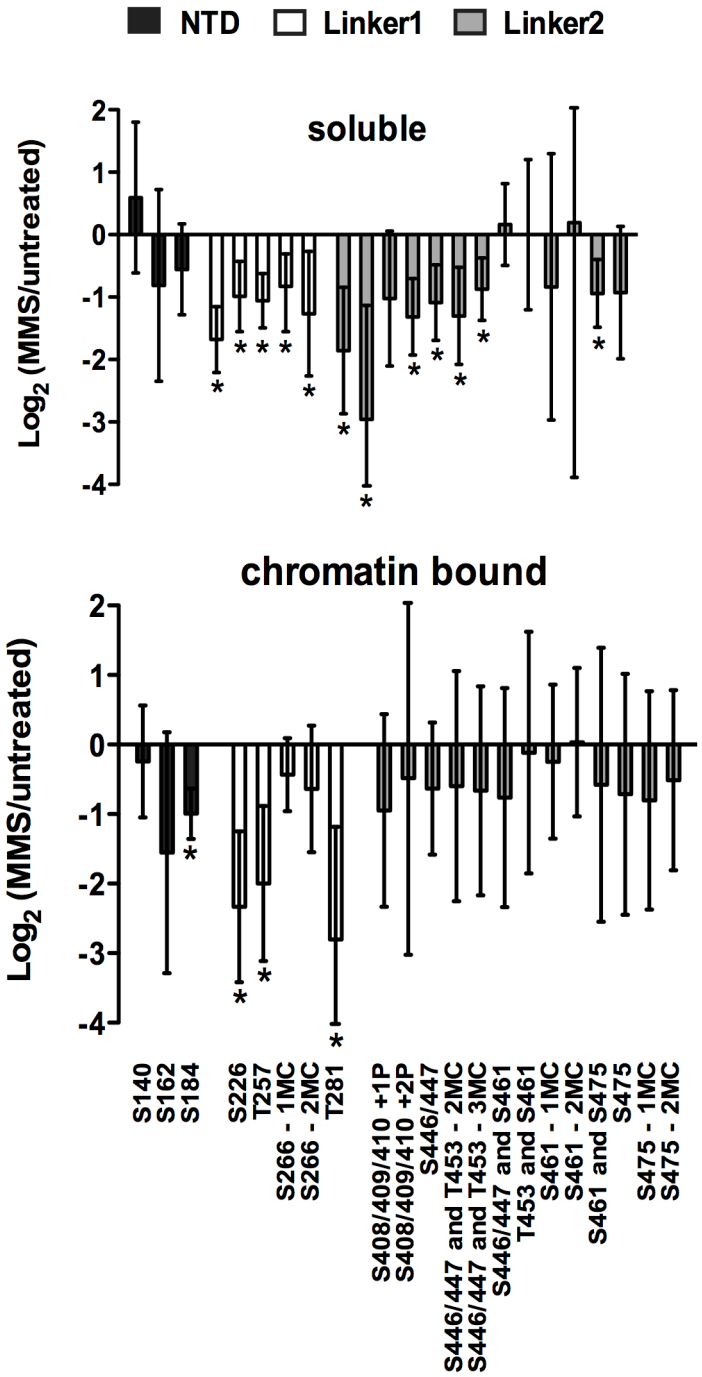

NTD
Linker1
Linker2
soluble
chromatin bound
Log2 (MMS/untreated)
2
1
0
-1
-2
-3
-4
S140
S162
S184
S226
T257
S266 - 1MC
S266 - 2MC
T281
S408/409/410 +1P
S408/409/410 +2P
S446/447
S446/447 and T453 - 2MC
S446/447 and T453 - 3MC
S446/447 and S461
T453 and S461
S461 - 1MC
S461 - 2MC
S461 and S475
S475
S475 - 1MC
S475 - 2MC

Figure 3

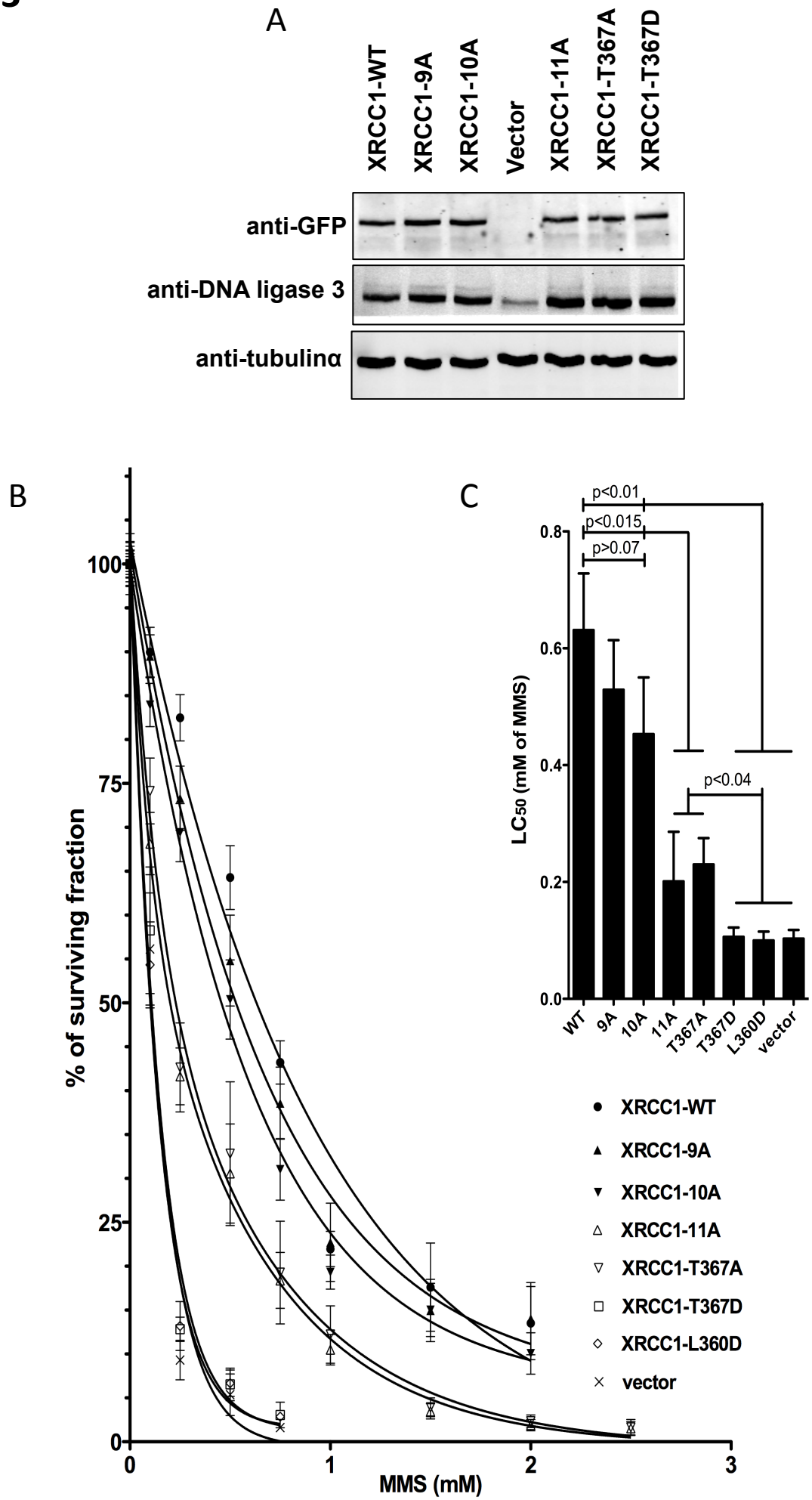

A
XRCC1-WT
XRCC1-9A
XRCC1-10A
Vector
XRCC1-11A
XRCC1-T367A
XRCC1-T367D
anti-GFP
anti-DNA ligase 3
anti-tubulinα
B
% of surviving fraction
MMS (mM)
XRCC1-WT
XRCC1-9A
XRCC1-10A
XRCC1-11A
XRCC1-T367A
XRCC1-T367D
XRCC1-L360D
vector
C
LC50 (mM of MMS)
p<0.01
p<0.015
p>0.07
p<0.04
WT
9A
10A
11A
T367A
T367D
L360D
vector

Figure 4

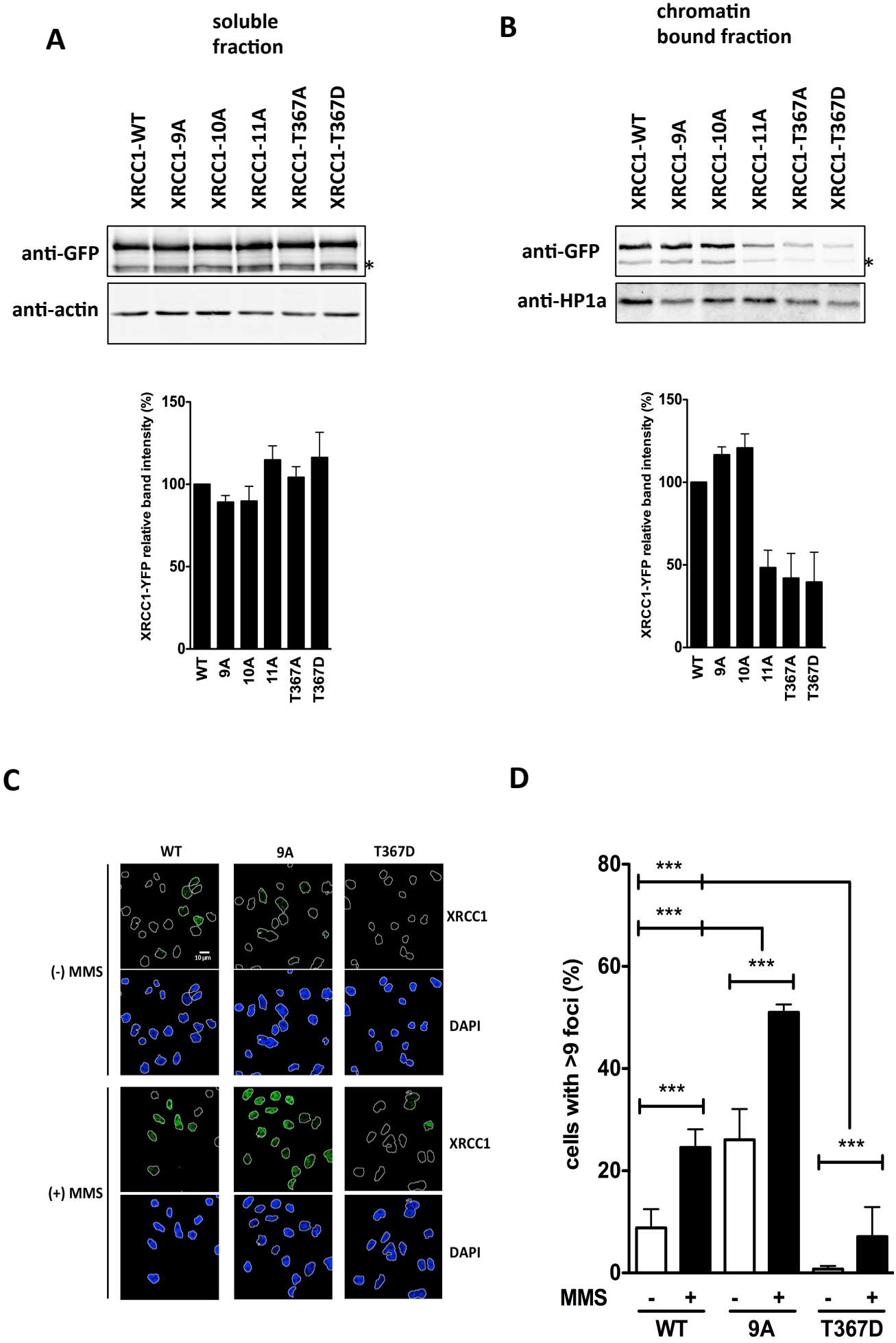
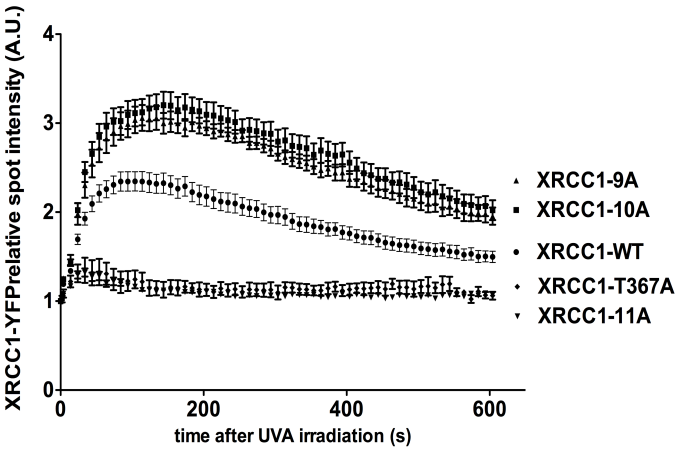
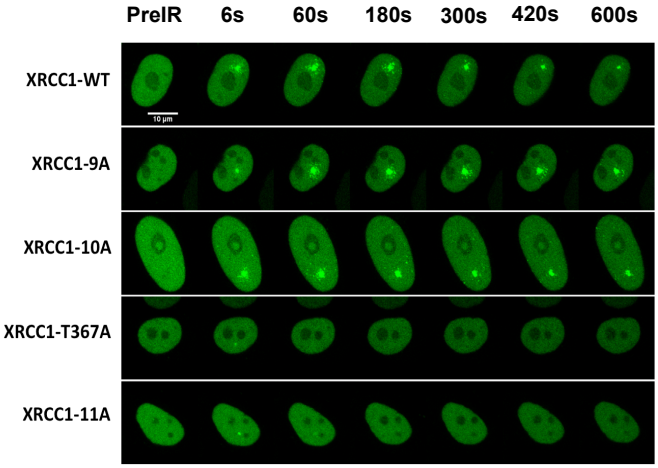

A
soluble fraction
XRCC1-WT
XRCC1-9A
XRCC1-10A
XRCC1-11A
XRCC1-T367A
XRCC1-T367D
anti-GFP
anti-actin
*
XRCC1-YFP relative band intensity (%)
150
100
50
0
WT
9A
10A
11A
T367A
T367D
B
chromatin bound fraction
XRCC1-WT
XRCC1-9A
XRCC1-10A
XRCC1-11A
XRCC1-T367A
XRCC1-T367D
anti-GFP
anti-HP1a
*
XRCC1-YFP relative band intensity (%)
150
100
50
0
WT
9A
10A
11A
T367A
T367D
C
WT
9A
T367D
(-) MMS
(+) MMS
XRCC1
DAPI
XRCC1
DAPI
10 µm
D
cells with >9 foci (%)
80
60
40
20
0
***
***
***
***
***
MMS
-
+
-
+
-
+
WT
9A
T367D

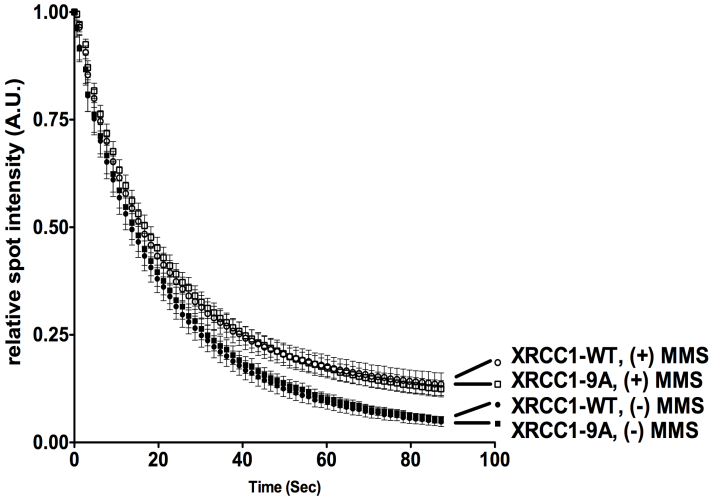
Figure 5

A


XRCC1-YFPrelative spot intensity (A.U.)
time after UVA irradiation (s)
XRCC1-9A
XRCC1-10A
XRCC1-WT
XRCC1-T367A
XRCC1-11A


PreIR
6s
60s
180s
300s
420s
600s
XRCC1-WT
XRCC1-9A
XRCC1-10A
XRCC1-T367A
XRCC1-11A

B


relative spot intensity (A.U.)
Time (Sec)
XRCC1-WT, (+) MMS
XRCC1-9A, (+) MMS
XRCC1-WT, (-) MMS
XRCC1-9A, (-) MMS

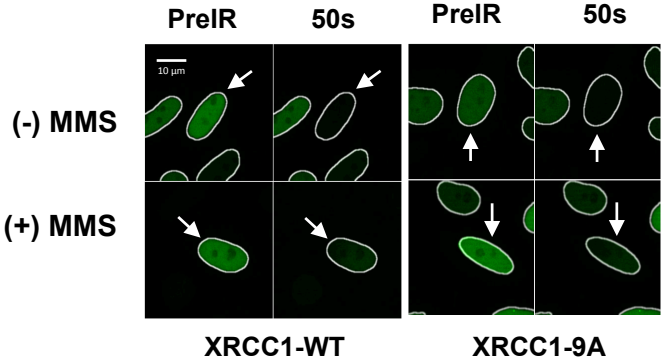

PreIR
50s
PreIR
50s
(-) MMS
(+) MMS
XRCC1-WT
XRCC1-9A

Figure 6

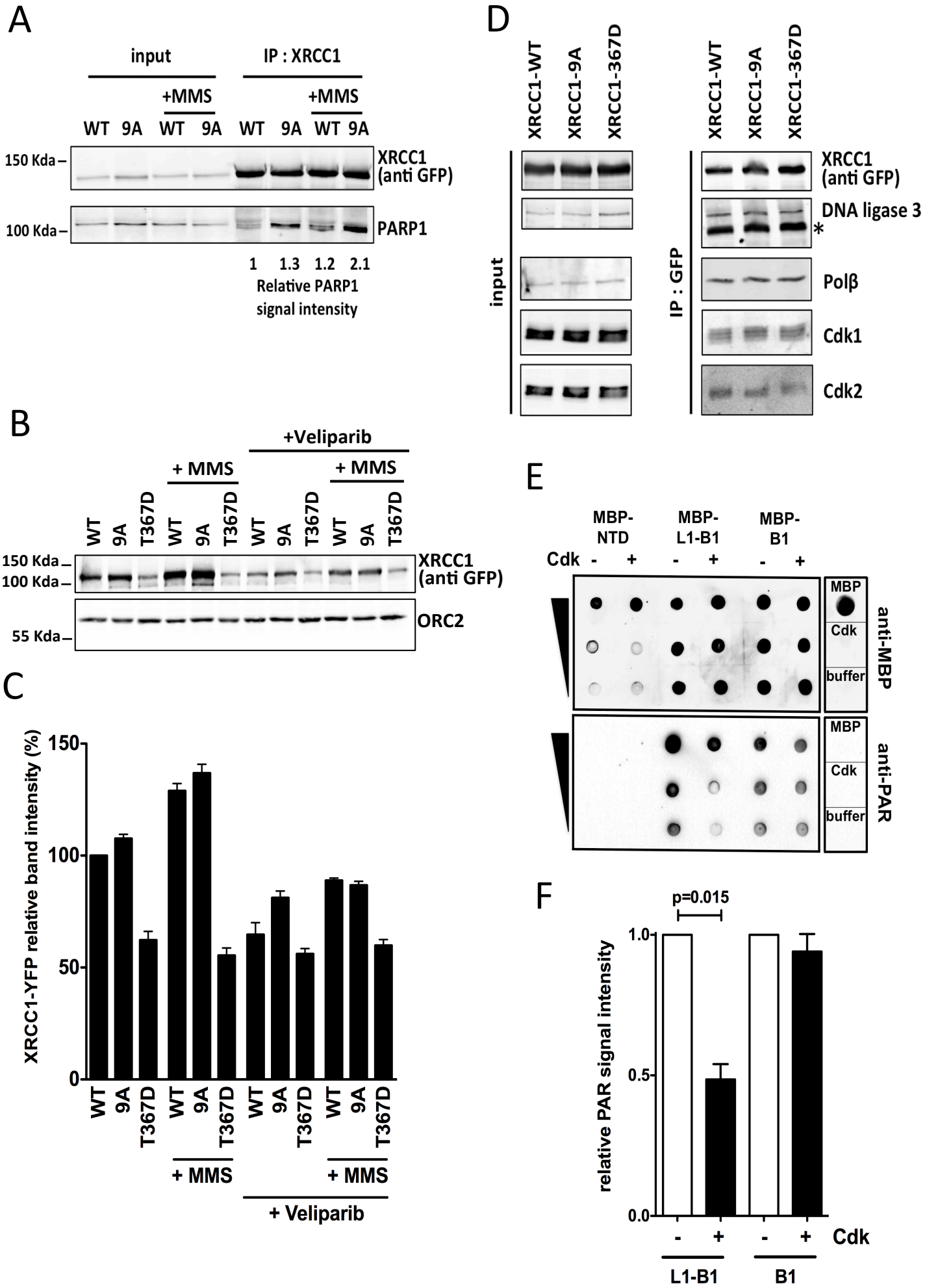

A
input
IP : XRCC1
+MMS
+MMS
WT 9A WT 9A WT 9A WT 9A
150 Kda
100 Kda
XRCC1 (anti GFP)
PARP1
1 1.3 1.2 2.1
Relative PARP1 signal intensity
B
+Veliparib
+ MMS
+ MMS
WT 9A T367D WT 9A T367D WT 9A T367D WT 9A T367D
150 Kda
100 Kda
55 Kda
XRCC1 (anti GFP)
ORC2
C
XRCC1-YFP relative band intensity (%)
150
100
50
0
WT 9A T367D WT 9A T367D WT 9A T367D WT 9A T367D
+ MMS
+ MMS
+ Veliparib
D
XRCC1-WT
XRCC1-9A
XRCC1-367D
input
IP : GFP
XRCC1 (anti GFP)
DNA ligase 3
*
Polβ
Cdk1
Cdk2
E
MBP-NTD
MBP-L1-B1
MBP-B1
Cdk - + - + - +
MBP
Cdk
buffer
anti-MBP
anti-PAR
F
p=0.015
relative PAR signal intensity
1.0
0.5
0.0
- + - + Cdk
L1-B1
B1

Figure legends

Figure 1 : The XRCC1-Linker1 region is phosphorylated by Cyclin dependent kinases *in vitro*. (**A**) The Linker1-BRCT1 XRCC1 regions are phosphorylated by Cdk1-cyclinB, Cdk2-cyclinA and Cdk5-p35 *in vitro*. Increasing amount of the GST-L1-B1 fusion protein was incubated *in vitro* with the indicated active kinase in presence of ^{32}P-ATP. The products of the kinase reaction were run on SDS-PAGE gels, stained with coomassie (top) and proteins phosphorylation was analyzed with phosphor-imaging (bottom). (**B**) Equal amount of the MBP-fusion proteins of XRCC1 fragments were incubated *in vitro* with active Cdk5-p35 kinase in presence of ^{32}P-ATP. The five XRCC1 regions are: N-terminal domain (NTD), BRCT1 (B1), Linker1 (L1), BRCT2 (B2) and Linker2 (L2). The products of the kinase reaction were run on SDS-PAGE gels, stained with Coomassie (left) and proteins phosphorylation was analyzed with phosphor-imaging (right). The position of Bovine Serum Albumin (BSA) added to the kinase reaction is indicated with an arrow, (*****) proteolytic fragment of the MBP-XRCC1 full length protein. (**C**) Schematic representation of the XRCC1 protein regions and of the MBP fused full length and truncated XRCC1 proteins used for *in vitro* kinase analysis. The phospho-signal from (B) was corrected for the amount of protein using the intensity of the coomassie staining. The relative phospho-signal intensity for each MBP-XRCC1 truncated fragments compared to the phospho-signal intensity of the MBP-XRCC1 full length protein is given. (**D**) Sequence of proteolytic phospho-specific XRCC1 peptides identified by mass spectrometry analysis of the MBP-XRCC1-L1-B1 incubated *in vitro* with Cdk5-p35, [1]best ion score determined by the Mascot search engine, numbers in the peptide sequence correspond to amino acids position in the XRCC1 human protein (UniProt-P18887). Phosphorylated serines (S) and threonines (T) positions in the XRCC1 protein sequence (UniProt-P18887) are indicated, all potentially phosphorylated residues are indicated when the phospho-position could not be determined with certainty. (**E**) The effect of the mutation of the 11 serines and threonines to alanine on the *in vitro* phosphorylation by the Cdk5-p35 kinase of increasing amount of the GST-L1-B1 fusion proteins.

Figure 2 : The soluble and the chromatin bound XRCC1 protein phosphorylation pattern is modified after cells treatment with MMS. (**A**) Schematic representation of the residues identified by MS to be phosphorylated from the MBP-Linker1-BRCT1 XRCC1 protein fragment incubated with Cdk5-p35 (*in vitro*) and from the immunoprecipitated XRCC1-eYFP (*in vivo*) (also see Supplementary Table S1 and S2). (**B**) The soluble XRCC1 protein is highly dephosphorylated while the chromatin bound XRCC1 protein is partially dephosphorylated after cells treatment with MMS. Four independent experimental repeats were performed to determine the normalized Log_2 ratio of each XRCC1 phospho-peptide intensities from MMS treated cells relative to the untreated cells are presented, the error bar presents the confidence interval 95%, * p value ≤ 0.05. Sequence of the analyzed peptide, Log_2 ratio, confidence interval 95% and p value are also reported in the Supplementary Table S3. Phosphorylated serines (S) and threonines (T) positions in the XRCC1 protein sequence are indicated. Identical peptides can be phosphorylated at one (+1P) or two (+2P) positions. The same phospho-sites can be found on distinct peptides resulting from 1, 2 and 3 missed cleavages (1MC, 2MC or 3MC) of the trypsin/AspN in-gel digestion. In case of phosphorylation position ambiguity, the potentially phosphorylated residues are indicated and separated with slash mark (/).

Figure 3 : Effect of XRCC1 mutations in the Linker1 and BRCT1 regions on MMS-induced sensitivity. (**A**) Levels of expression of the XRCC1-eYFP and the DNA ligase 3 proteins in the sorted EM9 cells stably expressing the indicated XRCC1-eYFP proteins or transfected with the empty vector, the eYFP protein expression was assessed by western blotting. (**B**) EM9 cells were exposed to the indicated concentration of MMS for 1 h, cell culture viabiliy was determined 5 days post-treatment. Each data point represent mean ± SD of 3-5 independent experiments with each dose in triplicate, these values were used to fit the presented survival curves. (**C**) Lethal concentration 50% (LC_{50}) of MMS extracted from EM9 cell populations survival curves.

Figure 4 : Linker1 phosphorylation affects XRCC1 cellular distribution. Western blot, probed with the indicated antibodies showing the soluble (**A**), and chromatin bound (**B**) fractions of 293T cells

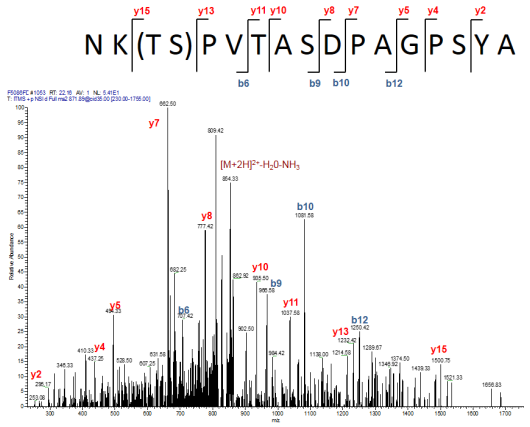
transfected with the indicated XRCC1 proteins and the respective western blot signal quantification of at least three independent experiments. (**C**) Representative microscopy images of EM9-XRCC1-WT, EM9-XRCC1-9A and EM9-XRCC1-T367D cells grown on coverslips, fixed and GFP immunostained for foci analysis. Scale bar : 10 μm. (**D**) Quantification of EM9 cells displaying more than nine XRCC1-eYFP foci in the absence of treatment (-) MMS or after MMS treatment (+) MMS (500 μM, 1 hour). The data represent mean ± SD of 3 independent experiments, total number (n) of EM9 cells analyzed is WT (-) MMS, n = 1248; 9A (-) MMS, n = 1223; T367D (-) MMS, n = 887; WT (+) MMS, n = 1123; 9A (+) MMS, n = 1212 and T367D (+) MMS, n = 897.

Figure 5 : Mobility of XRCC1 wild type and phopho-mutant proteins in HeLa cells. (**A**) Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of XRCC1-eYFP wild type and mutant proteins at UV laser-induced damage sites. Data represents mean relative spot intensity ± SEM, n = 5–30 individual cells from a minimum of two independent experiments. Representative images of the recruitment of the indicated fluorescent-tagged XRCC1 proteins are presented on the left. Scale bar = 10 μm. (**B**) Phosphorylation of XRCC1 affects its mobility after DNA damage induction. HeLa cells expressing either wild type XRCC1-WT or the Linker1 phospho-mutants XRCC1-9A or XRCC1-10A were untreated or treated with 500 μM MMS for 60 min before performing FLIP experiments. Data represents mean relative nuclei intensity ± SEM, n = 6–26 individual cells from a minimum of two independent experiments. Representative images of the fluorescent loss of the eYFP-tagged XRCC1 proteins by photobleaching are presented on the left. Scale bar = 10 μm.

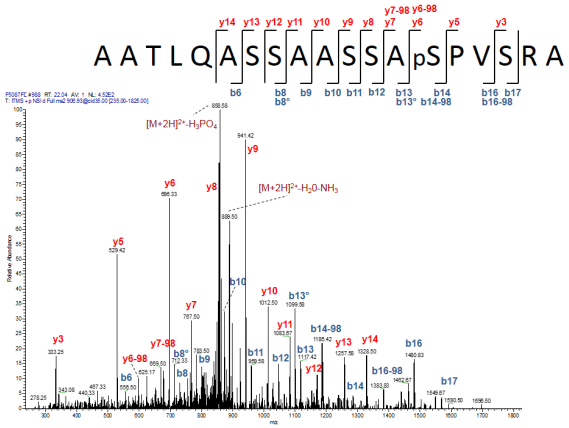
Figure 6 : Phosphorylation in the Linker1 region reduce XRCC1 PAR binding. (**A**) The XRCC1-9A mutant has a stronger affinity for PARP-1 than the XRCC1-WT protein in both untreated and MMS treated cells. The indicated XRCC1-eYFP and PARP-1 proteins from whole-cell extracts made from untreated 293T cells or 293T cells treated with 500 μM of MMS for 60 min (+MMS) are detected by western blot (input). The immunoprecipitation (IP) was carried out by using anti-GFP antibody and the co-immunoprecipitated endogenous PARP-1 was revealed by western blot. (**B**) The presence of the XRCC1 proteins in the chromatin fraction is PARP activity dependent. Representative western blot probed with the indicated antibodies showing the chromatin bound fractions of 293T cells transfected with the indicated XRCC1 proteins in untreated cells or after treatment with 500 μM of MMS for 60 min (+MMS) and/or Veliparib treatment. (**C**) Relative intensity in the XRCC1-YFP protein signal compared to the XRCC-WT-YFP signal in untreated cells of the western blot presented in (B). (**D**) The wild type protein XRCC1-WT, the XRCC1-9A and the XRCC1-T367D mutants equally interact with DNA ligase 3, Polymerase β, Cdk1 and Cdk2 *in vivo*. Whole cell extracts prepared from untreated 293T cells expressing the indicated XRCC1-eYFP proteins were subject to immunoprecipitation with anti-GFP antibody. The co-immunoprecipitated proteins (IP) were fractionated by SDS±PAGE and probed with the indicated antibodies, (*) XRCC1 proteins. The amount of extracts analyzed in the input blots is $1/10^{th}$ of the total extract. (**E**) The interactions between PAR and XRCC1 truncated fragment NTD, Linker1-BRCT1 (L1-B1) or BRCT1 (B1) recombinant MBP fusion proteins was examined by dot blot using anti-PAR antibody (top panel). The XRCC1 fragments were phosphorylated (+) or not (-) by the Cdk5/p35 kinase prior blotting 250 ng, 125 ng and 75 ng of recombinant protein on nitrocellulose membrane. On the right, the MBP protein (250 ng) and the active Cdk5/p35 (10 ng) and kinase buffer were blotted as negative controls. Blotted MBP proteins were detected by anti-MBP antibody (bottom panel). (**F**) Relative intensity in the PAR signal for phosphorylated compared to non-phosphorylated proteins.

Supplementary Figure S1

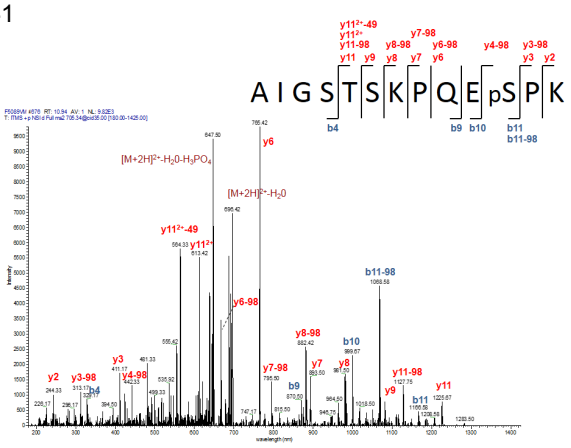
T198 or S199



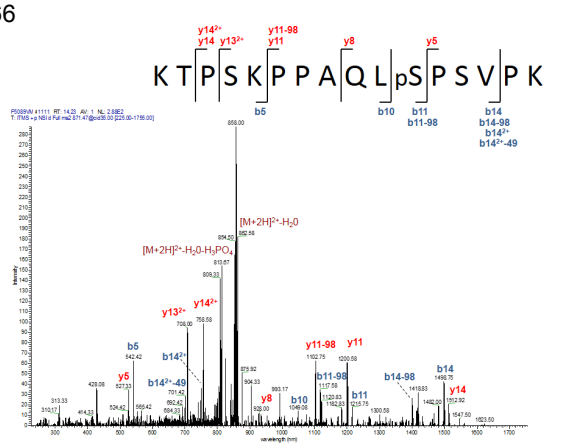
S226



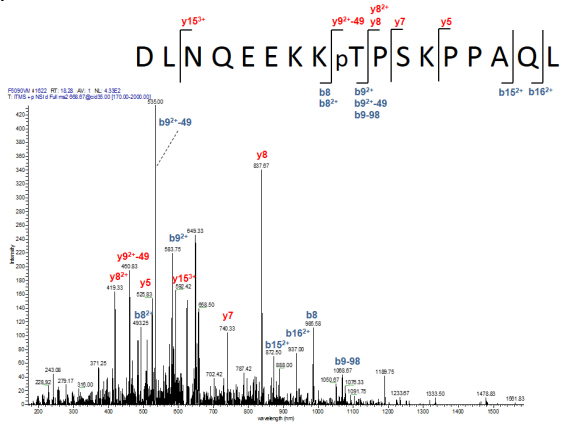
S241



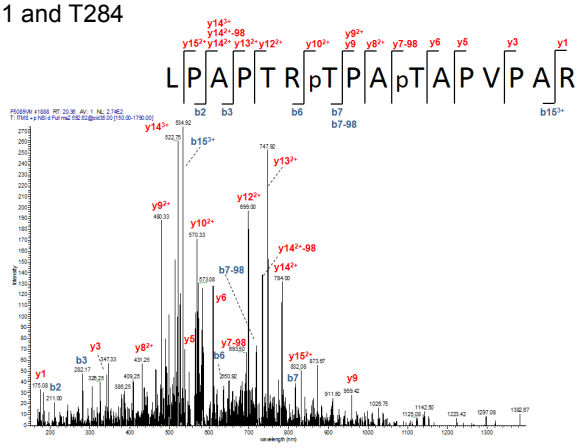
S266



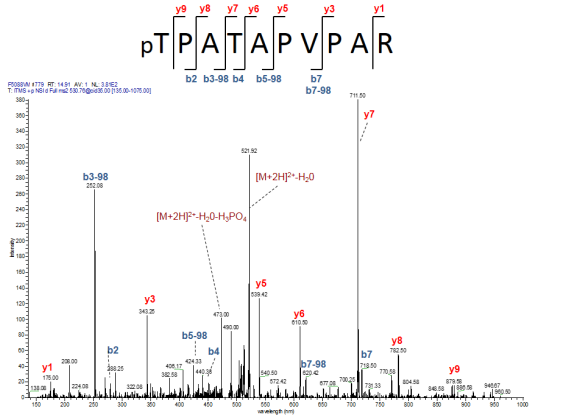
T257



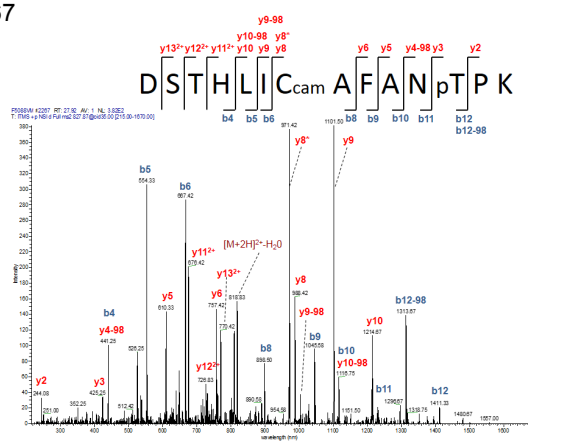
T281 and T284



T281

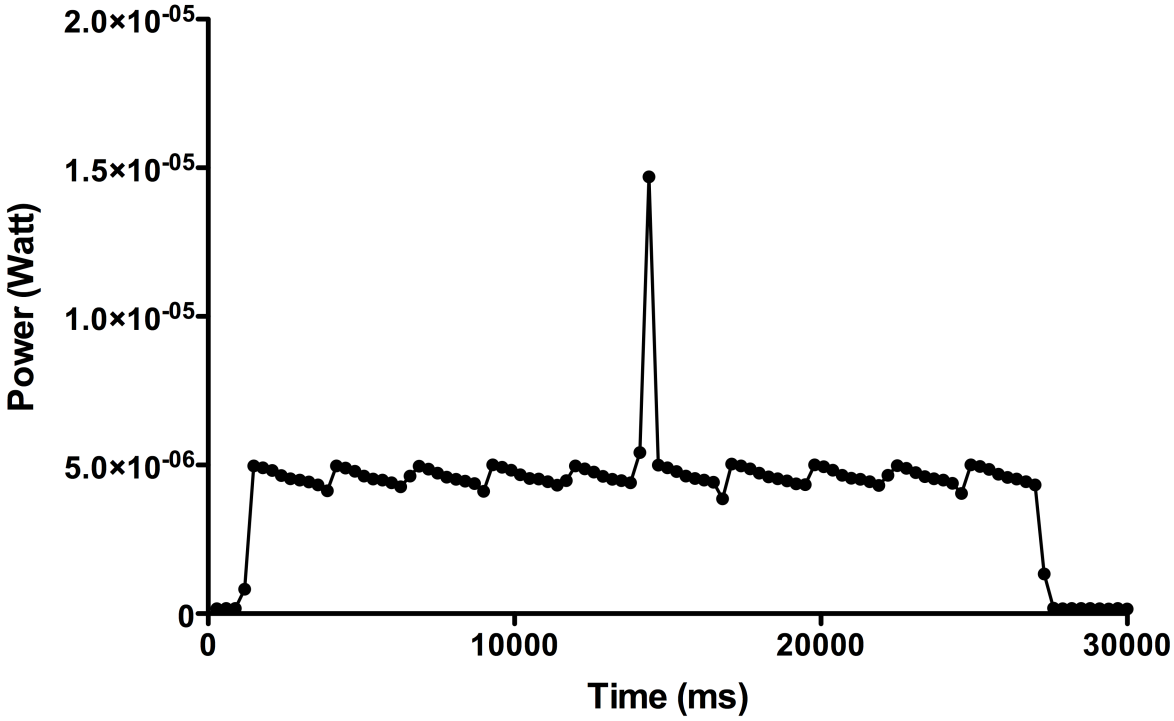


T367

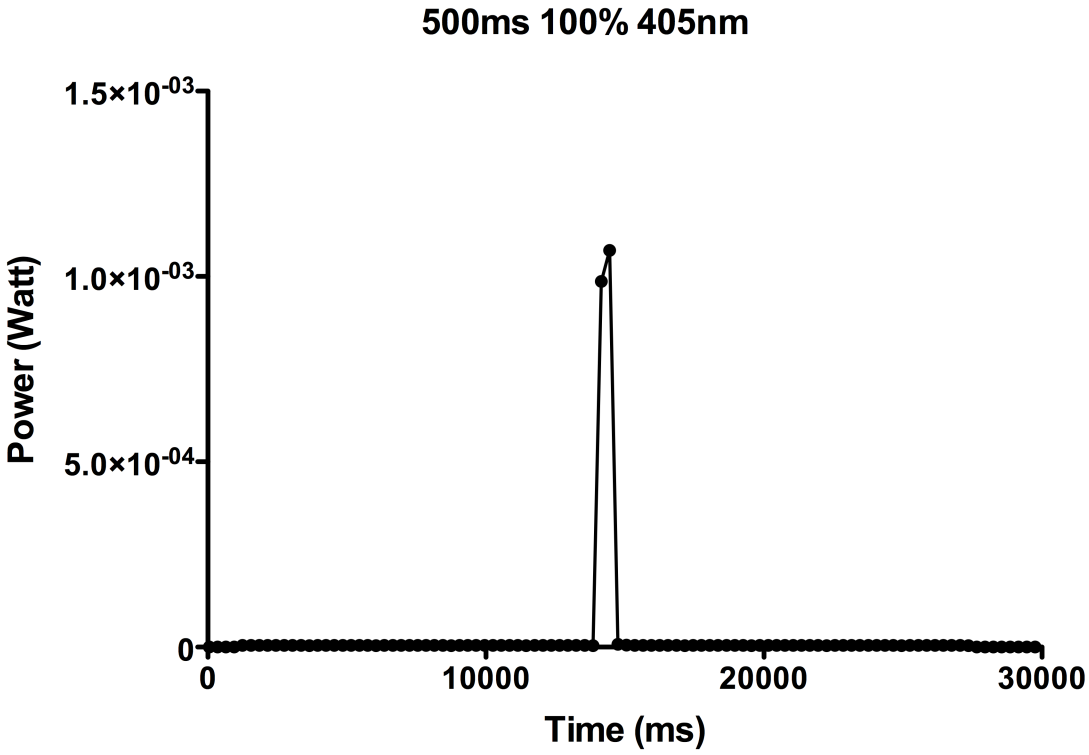


Supplementary Figure S2

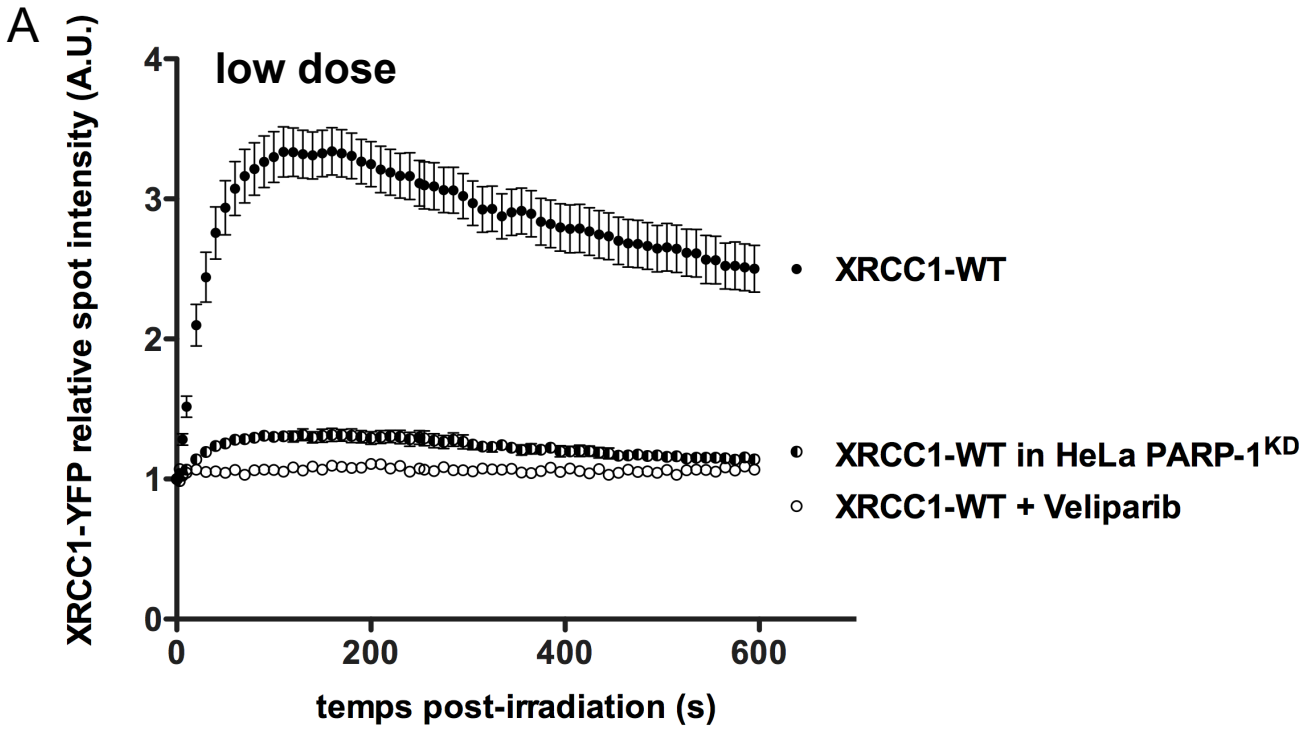
A

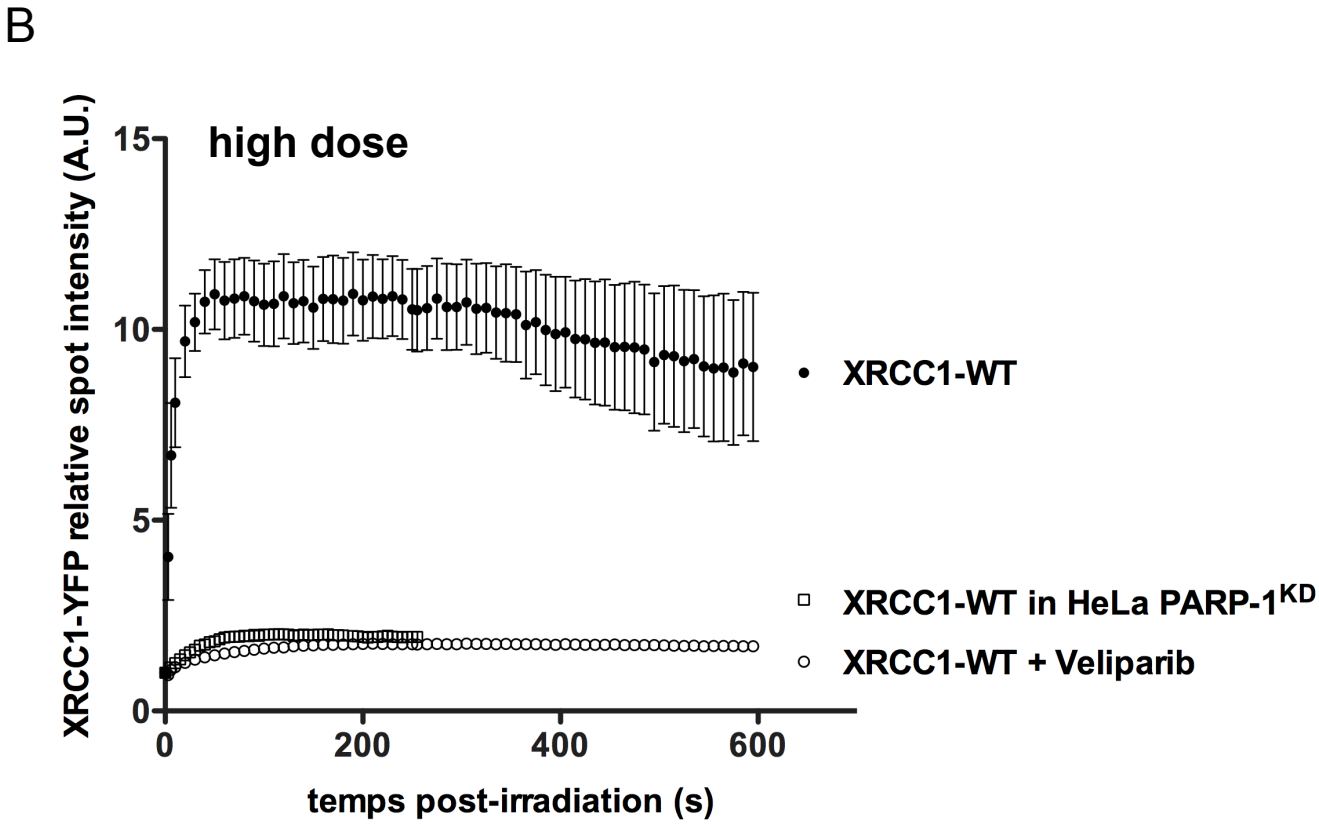


B

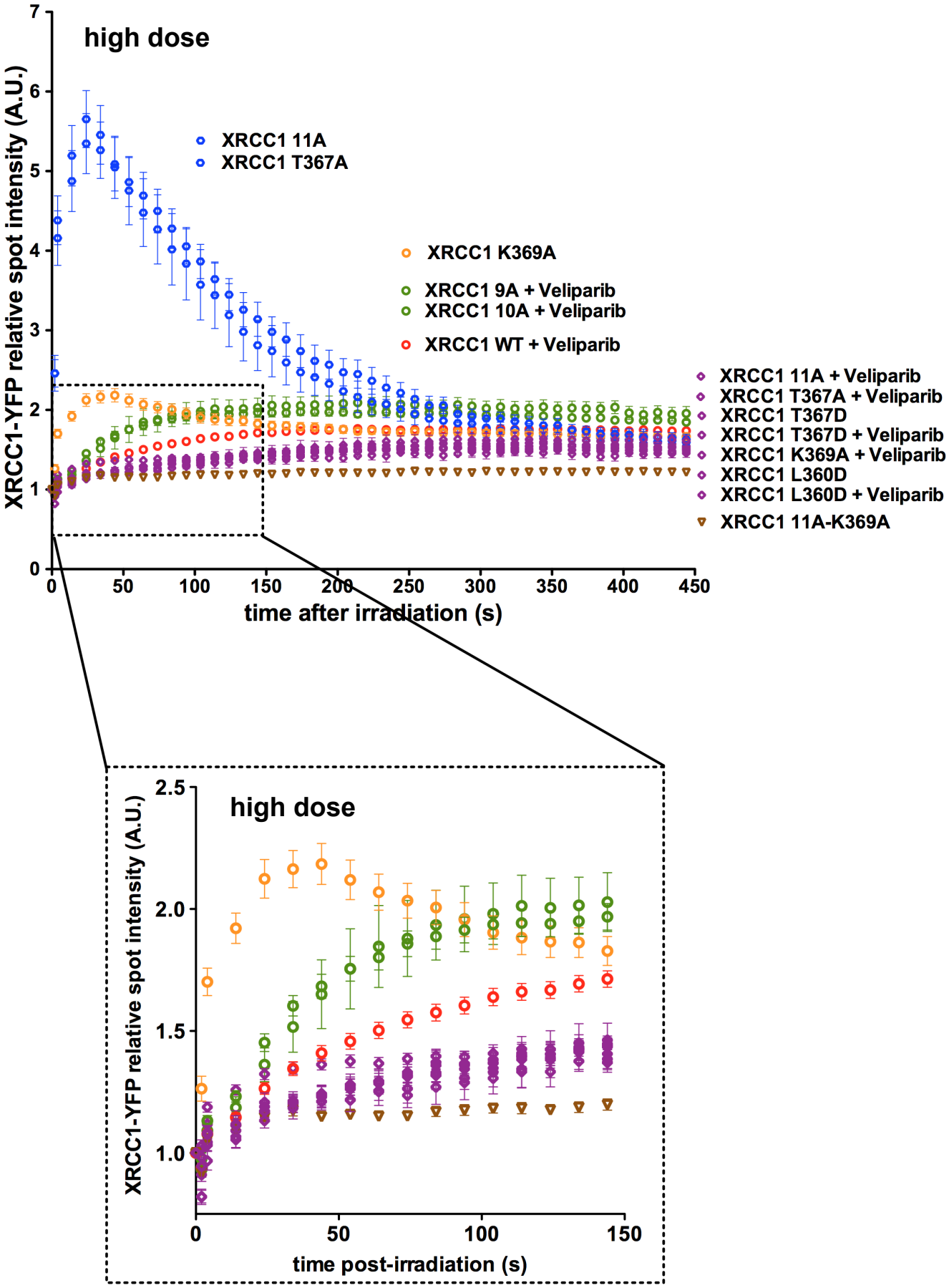


Supplementary Figure S3





C


high dose
XRCC1-YFP relative spot intensity (A.U.)
time after irradiation (s)
XRCC1 11A
XRCC1 T367A
XRCC1 K369A
XRCC1 9A + Veliparib
XRCC1 10A + Veliparib
XRCC1 WT + Veliparib
XRCC1 11A + Veliparib
XRCC1 T367A + Veliparib
XRCC1 T367D
XRCC1 T367D + Veliparib
XRCC1 K369A + Veliparib
XRCC1 L360D
XRCC1 L360D + Veliparib
XRCC1 11A-K369A
high dose
XRCC1-YFP relative spot intensity (A.U.)
time post-irradiation (s)

The dephosphorylation of the scaffolding protein XRCC1 in response to DNA damage regulates its BRCT1-dependent recruitment to DNA damage sites

Alexis Fouquin[1,2,5], Bérangère Lombard[3], Jo-Ann Nettersheim[1], Mohammed-Tayyib Boudra[1,2], Damarys Loew[3], Janet Hall[1,5], Vincent Pennaneach[1,5,6]

[1] Institut Curie, PSL Research University, Inserm, U612, Génotoxicologie, Signalisation et Radiothérapie Expérimentale, Centre de Recherche, F-91405 Orsay, France

[2] Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, UMR 3348, F-91405 Orsay, France

[3] Institut Curie, PSL Research University, Laboratoire Spectrométrie de Masse Protéomique, F-75005 Paris, France

[4] Present address: Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM, CNRS, UMR 1052-5286, F-69424 Lyon, France

[5] Present address: Institut Curie, PSL Research University, UMR 3348, Unite Stress Genotoxiques et Cancer, F-91405 Orsay, France

[6] To whom correspondence should be addressed: Vincent Pennaneach, Institut Curie, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay Cedex, France, Tel.: +33 (0)169863105; Fax: +33 (0)169075327; Email: vincent.pennaneach@curie.fr

Running title: XRCC1 phosphorylation regulates the BRCT1 domain functions.

Key words: XRCC1, cyclin-dependent Kinase (Cdk), DNA damage response, dephosphorylation, Poly(ADP-ribose) (PAR).

Supplementary figures legends

Supplementary Figure S1: Identification by MS of MBP-XRCC1-L1-B1 phosphorylated residues incubated *in vitro* with the active Cdk5/p35. Representative MS/MS spectra of the phospho-peptides detected in the MBP-L1-B1 XRCC1 fragment. The peptide sequence, the observed ions and the position of the phosphorylation (UniProt-P18887) are indicated above the spectrum.

Supplementary Figure S2: Measurements of the power output of the 405 nm diode for UV induced photodamage after low and high doses. The power output was measured using an optical energy meter (Thorlabs Inc.) for a sequence of five images acquisition (514 nm, Argon-laser line), one pulse of the UV diode for photodamage induction (405 nm) followed by five images acquisition (514 nm). (**A**) The low dose photo-damage conditions consisted of a laser beam pulse of 25 ms at 20% output setting, (**B**) and the high dose photo-damage conditions consisted of a laser beam pulse of 500 ms at 100% output setting.

Supplementary Figure S3: Mobility of XRCC1 wild type and phopho-mutant proteins in HeLa cells, in HeLa cells treated with 10 μM of the PARP inhibitor Veliparib (+ Veliparib) and in Hela cells depleted for the expression of the PARP-1 protein (Hela PARP-1^{KD}) [1]. The quantitative analysis of the relative spot intensity with time of XRCC1-eYFP wild type and mutant proteins at sites of low doses (**A**) and high doses (**B** and **C**) of UV laser-induced damage sites is presented. Data for the recruitment of the XRCC1-WT protein in the HeLa PARP-1^{KD} cells in (**S3B**) is from [2]. Data represents mean relative spot intensity ± SEM, n = 2–49 individual cells from a minimum of two independent experiments.

[1] C. Godon, F.P. Cordelieres, D. Biard, N. Giocanti, F. Megnin-Chanet, J. Hall, V. Favaudon, PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility, Nucleic acids research, 36 (2008) 4454-4464.

[2] M.T. Boudra, C. Bolin, S. Chiker, A. Fouquin, T. Zaremba, L. Vaslin, D. Biard, F.P. Cordelieres, F. Megnin-Chanet, V. Favaudon, M. Fernet, V. Pennaneach, J. Hall, PARP-2 depletion results in lower radiation cell survival but cell line-specific differences in poly(ADP-ribose) levels, Cellular and molecular life sciences : CMLS, 72 (2015) 1585-1597.

Supplementary Table S1: Sequence of phospho-specific XRCC1 peptides identified by mass spectrometry analysis of the MBP-L1-B1 XRCC1 fragment incubated *in vitro* with Cdk5-p35

Best ion score[1]	Peptide sequence[2]	Precursor ion charge	Phosphosite position[3]	PhosphoRS peptide position validation (%)	Digestion
31,5	NKTSPVTASDPAGPSYA	2+	T198/S199	49.2 for T3 and S4	Elastase
34,7	SDPAGPSYAAATLQASSAASSASPV	2+	S226	96,8	Elastase
74,6	AATLQASSAASSASPV	2+	S226	100	Elastase
40	AATLQASSAASSASPVSR	2+	S226	98,3	Elastase
78,9	AATLQASSAASSASPVSRA	2+	S226	100	Elastase
43,8	AATLQASSAASSASPVSRAIGS	2+	S226	89,4	Elastase
31,8	TLQASSAASSASPVS	2+	S226	91,2	Elastase
64,8	TLQASSAASSASPVSR	2+	S226	99,9	Elastase
82,2	TLQASSAASSASPVSRA	2+	S226	99,9	Elastase
38,1	SSAASSASPVSRAIGS	2+	S226	98,9	Elastase
63,3	SSAASSASPVSRA	2+	S226	99,9	Elastase
48,8	SAASSASPVSRA	2+	S226	99	Elastase
82,5	INKTSPVTASDPAGPSYAAATLQASSAASSASPVSR	3+	S226	99,4	Trypsin
64,9	TSPVTASDPAGPSYAAATLQASSAASSASPVSR	3+	S226	99,4	Trypsin
36,4	IGSTSKPQESPKG	2+	S241	100	Elastase
45,5	AIGSTSKPQESPKGK	2+	S241	90,6	Trypsin
53,7	AIGSTSKPQESPK	2+	S241	100	Trypsin
26,7	KTPSKPPAQLSPSVPK	3+	T257 and S266	80,2	Trypsin
34,9	KTPSKPPAQLSPSVPK	2+	S266	99,2	Trypsin
20,4	TPSKPPAQLSPSVPK	2+	S266	90,8	Trypsin
25,9	DLNQEEKKTPSKPPAQL	2+	T257	98,7	Chymotrypsin
39,4	LPAPTRTPATAPVPAR	3+	T281 and T284	100	Trypsin
53,2	TPATAPVPAR	2+	T281	100	Trypsin
42,8	DSTHLICAFANTPK	2+	T367	100	Trypsin

[1]Best ion score determined by the Mascot search engine.

[2]Phosphorylated residues are underlined in the peptide sequence.

[3]Phosphorylated serines (S) and threonines (T) positions' in the XRCC1 protein sequence (UniProt-P18887) are indicated, alternativelly, slash mark (/) separates potentially phosphorylated residues when the phospho-position could not be determined with certainty.

Supplementary Table S2: Constitutive phospho-sites identified by LC-MS/MS from the immunoprecipitated XRCC1-eYFP

XRCC1 region	Best ion score[1]	Peptide sequence[2]	Precursor ion charge	PhosphoRS peptide position validation (%)	Phosphosite position[3]
NTD	27.8	DSPFGLSFVR	2+	100	S140
	65.1	DEAEAPSQKVTVTK	2+	100	S162
	54.1	DESANSLRPGALFFSR	2+	100	S184
Linker1	115.8	DPAGPSYAAATLQASSAASSASPVSR	2+	83.3	S210
	118	DPAGPSYAAATLQASSAASSASPVSR	2+	90	T215
	120.8	DPAGPSYAAATLQASSAASSASPVSR	2+	98.9	S226
	47.4	AIGSTSKPQESPK	2+	99.8	S241
	35.9	DLNQEEKKTPSKPPAQLSPSVPK	4+	98.9	T257
	48.9	TPSKPPAQLSPSVPK	2+	99.5	S266 - 1MC
	78.1	KTPSKPPAQLSPSVPK	2+	99.6	S266 - 2MC
	69.46	KTPSKPPAQLSPSVPKRPK	3+	99.3	S266 - 3MC
	20.7	LPAPTRTPATAPVPAR	3+	49.7 for T5 and T7	T281
Linker2	25.1	YLMAGPGSSSEE	2+	33.3 for S8. S9 and S10	408/409/410 +1P
	41.1	YLMAGPGSSSEE	2+	33.3 for S8. S9 and S8. S10 and S9. S10	408/409/410 +2P
	60.2	TKPTQAAGPSSPQKPPTPEETK	2+	49.7 for S10 and S11	446/447
	35.5	TKPTQAAGPSSPQKPPTPEETK	3+	49.6 for S10. T17 and S11. T17	446/447 and 453 - 2MC
	43.8	TKPTQAAGPSSPQKPPTPEETKAASPVLQE	3+	42.4 for S10. T17 and S11. T17	446/447 and 453 - 3MC
	23.7	TKPTQAAGPSSPQKPPTPEETKAASPVLQE	3+	74 for T4. S25 and 11.5 for S10. S25 and S11. S25	446/447 and 461
	25.5	TKPTQAAGPSSPQKPPTPEETKAASPVLQE	3+	23.3 for S10. T17. S25 and S10. T21. S25 and S11. T17. S25 and S11. T21. S25	446/447, 453 and 461
	35.7	AASPVLQEDI	2+	100	S461 - 1MC
	63.1	AASPVLQEDIDIEGVQSEGQ	2+	100	S461 - 2MC
	37.2	AASPVLQEDIDIEGVQSEGQ	2+	100	S461 and S475
	60	AASPVLQEDIDIEGVQSEGQ	2+	100	S475
	51.9	DIDIEGVQSEGQ	2+	100	S475 - 1MC
	26.2	DIEGVQSEGQ	2+	100	S475 - 2MC

[1]Best ion score determined by the Mascot search engine.
[2]Phosphorylated residues are underlined in the peptide sequence.
[3]Phosphorylated serines (S) and threonines (T) positions' in the XRCC1 protein sequence (UniProt-P18887) are indicated,
slash mark (/) separates potentially phosphorylated residues when the phospho-position could not be determined with certainty,
identical peptides can be phosphorylaed on one (+1P) or two (+2P) residus,
the same phospho-sites can be found on distinct peptides that result from 1, 2 and 3 missed cleavages (1MC, 2MC or 3MC) of the trypsin/AspN in-gel digestion.

Supplementary Table S3: Quantification of the soluble and the chromatin bound XRCC1 protein phosphorylation levels after cells treatment with 500 µM MMS for 60 min

			Soluble fraction				Chromatin bound fraction			
XRCC1 region	Phospho-site position[1]	Peptide sequence[2]	Log_2 ratio (MMS/untreated)	IC 95% lower limit	IC 95% upper limit	*p* value	Log_2 ratio (MMS/untreated)	IC 95% lower limit	IC 95% upper limit	*p* value
NTD	S140	DSPFGLSFVR	0,594	-0,614	1,801	0,37236	-0,244	-1,049	0,561	0,57403
	S162	DEAEAPSQKVTVTK	-0,811	-2,346	0,724	0,34024	-1,554	-3,287	0,178	0,12917
	S184	DESANSLRPGALFFSR	-0,556	-1,285	0,173	0,18544	-0,993	-1,355	-0,631	0,00171
Linker1	S226	DPAGPSYAAATLQASSAASSASPVSR	-1,679	-2,206	-1,152	0,00078	-2,334	-3,420	-1,249	0,00559
	T257	DLNQEEKKTPSKPPAQLSPSVPK	-0,989	-1,553	-0,425	0,01384	-1,999	-3,115	-0,882	0,01269
	S266 - 1MC	TPSKPPAQLSPSVPK	-0,825	-1,342	-0,309	0,02032	-0,434	-0,958	0,090	0,15587
	S266 - 2MC	KTPSKPPAQLSPSVPK	-1,057	-1,493	-0,622	0,00314	-0,637	-1,549	0,274	0,21956
	T281	LPAPTRTPATAPVPAR	-1,266	-2,262	-0,270	0,04710	-2,803	-4,424	-1,181	0,01473
Linker2	S408/409/410 +1P	YLMAGPGSSSEE	-1,855	-2,869	-0,842	0,01155	-0,947	-2,332	0,437	0,22833
	S408/409/410 +2P	YLMAGPGSSSEE	-2,957	-4,780	-1,135	0,01907	-0,483	-3,022	2,056	0,72197
	S446/447	TKPTQAAGPSSPQKPPTPEETK	-1,023	-2,103	0,058	0,11296	-0,632	-1,581	0,317	0,23982
	S446/447 and T453 - 2MC	TKPTQAAGPSSPQKPPTPEETK	-1,317	-1,930	-0,705	0,00559	-0,597	-2,251	1,056	0,50546
	S446/447 and T453 - 3MC	TKPTQAAGPSSPQKPPTPEETKAASPVLQE	-1,088	-1,693	-0,483	0,01247	-0,663	-2,166	0,839	0,42006
	S446/447 and S461	TKPTQAAGPSSPQKPPTPEETKAASPVLQE	-1,302	-2,079	-0,525	0,01676	-0,763	-2,337	0,811	0,37847
	T453 and S461	TKPTQAAGPSSPQKPPTPEETKAASPVLQE	-0,872	-1,372	-0,371	0,01428	-0,117	-1,855	1,621	0,89943
	S461 - 1MC	AASPVLQEDI	0,161	-0,494	0,817	0,64618	-0,247	-1,354	0,861	0,67752
	S461 - 2MC	AASPVLQEDIDIEGVQSEGQ	0,001	-1,202	1,204	0,99856	0,035	-1,032	1,102	0,95087
	S461 and S475	AASPVLQEDIDIEGVQSEGQ	-0,835	-2,966	1,296	0,47157	-0,579	-2,549	1,390	0,58527
	S475	DIEGVQSEGQ	0,194	-3,886	4,274	0,92862	-0,715	-2,448	1,019	0,44992
	S475 - 1MC	DIDIEGVQSEGQ	-0,940	-1,481	-0,399	0,01438	-0,803	-2,374	0,768	0,35528
	S475 - 2MC	AASPVLQEDIDIEGVQSEGQ	-0,928	-1,990	0,133	0,13740	-0,511	-1,806	0,785	0,46917

[1]Phosphorylated peptides were validated by combining the phosphoRS information and by manually inspecting the peak assignment,
slash mark (/) separates potentially phosphorylated residues when the phospho-position could not be determined with certainty,
identical peptides can be phosphorylaed on one (+1P) or two (+2P) residues,
the same phospho-sites can be found on distinct peptides resulting from 1, 2 and 3 missed cleavages (1MC, 2MC or 3MC) of the trypsin/AspN in-gel digestion.
[2]Validated phospho-sites are underlined.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence d'une part que le rôle de la protéine PARP2 sur la régulation de l'activité de PARP1 est dépendent du contexte cellulaire et d'autre part des nouvelles fonctions de de PARP2 dans la régulation du choix des voies de la réparation des CDBs de l'ADN. Le second axe de recherche que j'ai développé m'a permis de déterminer que la dynamique de phosphorylation/déphosphorylation de l'interdomaine 1 de la protéine XRCC1 après des dommages de l'ADN est le déterminant de son efficacité de recrutement dépendant des PAR aux sites de dommages. Dans cette section, je discute des implications de ces résultats.

1. PARP2 et le métabolisme des PAR

Au cours de l'étude rapportée dans le premier article présenté dans ce manuscrit (Boudra et al., 2015), nous avons mis en évidence que les MEF déficientes pour PARP2 présentent une diminution de l'activité PARP, alors qu'une augmentation de l'activité PARP d'environ 20% est observée dans la lignée HeLa shPARP2, et qu'aucune variation n'est vue dans la lignée U2OS ainsi que dans une lignée de fibroblastes immortalisés (Boudra et al., 2015). Ces observations indiquent que la contribution de PARP2 au métabolisme global des PAR est variable, voir négligeable, dans certaines lignées cellulaires, alors que PARP2 pourrait réguler négativement le niveau de synthèse de PAR dans d'autres. En effet, il a été observé que le niveau de synthèse de PAR est plus important dans des lignées murines de lymphocytes B et de thymocytes issues des souris KO pour PARP2, que dans les lignées contrôles correspondantes (Ambrose et al., 2009; Navarro et al., 2017; Robert et al., 2009; Yelamos et al., 2006). A l'inverse, l'activité PARP est réduite dans les lignées murines de fibroblastes immortalisés (Schreiber et al., 2002) ou embryonnaires (Ame et al., 1999), ainsi que de cellules musculaires (Szántó et al., 2011). Ceci indique que dans certains modèles cellulaires, PARP2 pourrait réguler négativement l'activité de PARP1. De même, dans les lignées U2OS et AS3WT2 (aussi dénommée HF), il est aussi possible que l'activité de PARP1 soit plus importante que dans la lignée contrôle correspondante, masquant alors la contribution réelle de PARP2. Cependant malgré les différences observées dans l'activité PARP globale dans les trois lignées cellulaires étudiées, PARP2 contribue néanmoins au maintien de la survie en réponse aux radiations ionisantes

Ces travaux mettent aussi en évidence qu'en absence de PARP2, l'expression de PARG est diminuée, ce qui pourrait augmenter par conséquent la durée de demi-vie des PAR. L'essai d'activité PARP utilisé dans cette étude repose sur la stimulation maximale des PARPs par des oligonucléotides, dans des cellules perméabilisées. L'une des conséquences de l'augmentation de la durée de vie des PAR pourrait donc être une augmentation indirecte dans la mesure des PAR dans notre essai d'activité PARP. Cependant, la déplétion de PARG n'affecte pas la mesure de l'activité PARP de notre essai, écartant donc la possibilité que la réduction de l'activité PARG dans les cellules déplétées pour PARP2 soit responsable de l'augmentation de l'activité PAR détectée. Il est possible que dans cet essai d'activité PARP, l'action de PARG ne soit pas immédiate ou alors que l'activité PARP soit stimulée si fortement que la contribution de PARG en devient négligeable. L'ensemble de ces résultats indiquent donc l'activité de PARP1 est plus importante en absence de PARP2. Ceci est consistant avec l'observation que la présence de PARP2 pourrait diminuer l'activation de PARP1 *in vitro* (Kutuzov et al., 2013b). Dans certaines lignées cellulaires, PARP2 a donc un effet inhibiteur sur PARP1.

L'effet d'une augmentation de l'activité de PARP1 dans un contexte où PARP2 est absent à plusieurs conséquences. Tout d'abord, nous avons pu observer que le recrutement de PARP1, aux sites de dommages induits par microirradiation laser, était diminué, dans des conditions où l'activité de PARP1 est plus importante. Ceci pourrait s'expliquer par une augmentation de la répulsion électrostatique entre les charges négatives portées par les PAR et celles portées par l'ADN, dans un contexte où l'activité de PARP1 est fortement augmentée. De plus, il a été décrit que la phosphorylation de PARP1 par la kinase c-Met, stimule l'activité de PARP1 et diminue l'affinité de PARP1 pour les inhibiteurs de PARP ainsi que pour la chromatine, provoquant alors une résistance des cellules tumorales aux effets cytotoxiques des inhibiteurs de PARP (Du et al., 2016). Cette dernière observation pourrait donc indiquer que l'augmentation de l'activité de PARP1, dans certaines lignées cellulaires déficientes pour PARP2, puissent induire une résistance aux inhibiteurs de PARP. Il serait donc très intéressant de déterminer si la lignée HeLa shPARP2 est plus résistante aux inhibiteurs de PARP que la lignée contrôle, et si dans un contexte plus général, l'activité de PARP1 pourrait être un biomarqueur de résistance/sensibilité aux inhibiteurs de PARP.

La déplétion de PARP2 dans la lignée HeLa affecte aussi le recrutement de la protéine XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN. Sachant que la déplétion de PARP2 dans les lignées U2OS et AS3WT2 n'affecte pas le recrutement de XRCC1, il est probable que la diminution du recrutement de PARP1 dans la lignée HeLa soit responsable du défaut d'accumulation de XRCC1 aux sites de microirradiation laser. De plus, sachant que XRCC1 régule négativement l'activité de PARP1, la diminution du recrutement de XRCC1 pourrait aussi contribuer à augmenter l'activité de PARP1 (Masson et al., 1998a). Finalement, nous avons aussi observé une diminution du recrutement de PARG et de PCNA aux sites de microirradiation laser, en absence de PARP2. Le recrutement de PARG est dépendant à la fois des PAR mais aussi de l'interaction avec PCNA (Mortusewicz et al., 2011a), et celui de PCNA pourrait être partiellement dépendant de XRCC1 (Hanssen-Bauer et al., 2011). Sur la base de ces observations nous suggérons que l'augmentation de l'activité de PARP1 en l'absence de PARP2, conduit à la diminution du recrutement de XRCC1, et donc de PCNA, ce qui en retour affecte le recrutement de PARG. Le recrutement plus faible de PARG pourrait aussi contribuer à augmenter localement la quantité de PAR. La déplétion de PARP2 pourrait donc affecter une boucle de rétrocontrôle, permettant de réguler finement la synthèse locale des PAR et affecter les cinétiques de réparation des dommages de l'ADN.

Ce mécanisme complexe de régulation du métabolisme des PAR dépendant de PARP2 est par ailleurs rapidement réversible dès que l'expression de PARP2 est restaurée dans la lignée HeLa, indiquant donc qu'il ne s'agit probablement pas d'un mécanisme d'adaptation cellulaire à la perte de PARP2 à long terme, mais plutôt bien d'un mécanisme de contrôle de l'activité de PARP1 par PARP2. Il serait donc intéressant dans ce cadre de déterminer l'impact de PARP2 sur les niveaux cellulaires de NAD+, qui pourraient être largement réduit de par l'activation importante de PARP1, dans les cellules HeLa déplétées pour PARP2. En effet, l'activation de SIRT1, qui est très largement dépendante du niveau de NAD+ (Pillai et al., 2005), ainsi que la boucle de régulation d'activité entre SIRT1 et PARP1 (Bai et al., 2011b), pourraient aussi être dérégulée dans un contexte où PARP2 est absent. Nous ne donc pouvons pas exclure que ces mécanismes soient en partie responsable de la dérégulation de l'expression des gènes et des dérégulation du métabolisme observé dans un contexte déficient pour PARP2 (Bai et al., 2011a).

2. PARP1, PARP2 et réparation des CDBs

Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence que PARP2 stimule la résection des extrémités d'ADN en réponse à l'induction de CDBs, stimulant ainsi les voies de la RH, du SSA, du Alt-EJ, et inhibant la voie du C-EJ. Ainsi, l'absence de PARP2 est associée avec une diminution de la taille des délétions observées aux points de jonction post-réparation par les voies de jonctions des extrémités. En revanche, la déplétion de PARP1 n'affecte pas l'efficacité des voies de la réparation des CDBs de l'ADN, indiquant un rôle spécifique de PARP2. L'observation que PARP1 n'affecte pas l'efficacité de la réparation des CDBs induites par I-Sce1 par la RH ou par les voies de jonctions des extrémités, a été décrite par plusieurs études (Mansour et al., 2010; Schultz et al., 2003; Yang et al., 2004). A l'inverse, il a été observé que PARP1 pourrait faciliter la RH après induction d'une CDB par I-Sce1 (Xie et al., 2015), mais cette contradiction n'a pas été expliquée à ce jour. Une explication possible est que le rôle essentiel de PARP1 dans le recrutement de nombreux complexes de remodelage de la chromatine aux sites de dommages de l'ADN, puisse faciliter la RH (Ahel et al., 2009; Chou et al., 2010; Eustermann et al., 2010; Khoury-Haddad et al., 2014; Timinszky et al., 2009a). Le rôle de PARP1 dans la RH pourrait donc être en partie dépendant du contexte chromatinien, comme cela a été suggéré au sein de la voie du C-EJ (Luijsterburg et al., 2016b).

Néanmoins, il est clair que PARP1 est essentiel dans la voie du Alt-EJ, en absence de la protéine Ku (Mansour et al., 2013; Mansour et al., 2010). En présence de Ku, il semble que PARP1 n'affecte pas l'efficacité de la jonction des extrémités, ce qui est en accord avec ce que nous avons observé. Toutefois, même si l'efficacité de l'initiation de la voie du Alt-EJ n'est pas affectée en absence de PARP1 (définie par la perte de nucléotides en dehors de l'overhang de 4 pb produit par I-Sce1), une diminution de la taille moyenne des délétions a été observée. En effet la taille moyenne des délétions est de 48pb ± 8pb pour le siControl, 28pb ± 7pb pour le siPARP2 et 21pb ± 6pb pour le siPARP1 (nombre moyen de pb perdues par séquence ± SEM) (voir Annexe 1). Ces informations suggèrent donc un rôle de PARP2 dans l'initiation de la résection alors que PARP1 pourrait favoriser l'extension de la résection au cours de la réparation par la voie du Alt-EJ. Cependant, la reconstruction du gène d'expression de la GFP par la réparation d'une coupure I-Sce1 dans le substrat SA-GFP(SSA) requière la résection d'au moins 2.7 kb. Il est donc peu probable que PARP1 favorise la résection longue, puisque la déplétion de PARP1 n'affecte pas l'efficacité du SSA (nos données non publiées).

De plus, nous avons observé que l'inhibition de PARP1 et de PARP2 par le veliparib, un inhibiteur de PARP testé en clinique, n'affecte pas l'efficacité de la jonction des extrémités par C-EJ ou Alt-EJ, ni celle de la RH. Ces résultats indiquent d'une part que l'activité de PARP1 et de PARP2 n'est pas requise, et d'autre part que les effets sur la réparation des CDBs causés par la déplétion de PARP2 ne sont pas dû à une dérégulation de l'activité de PARP1, comme nous l'avons observé dans la lignée HeLa (Boudra et al., 2015). Ces données sont confortées par l'observation que la forme inactive de PARP2, dans laquelle le glutamate du motif H-Y-E est remplacé par une alanine (mutant PARP2 E545A), restaure l'efficacité du C-EJ des cellules déficientes pour PARP2. De plus, nous avons précédemment observé que la déplétion de PARP2 dans la lignée AS3WT2 (ou HF) ne modifie pas l'activité PARP globale (Boudra et al., 2015). Puisque les lignées HF EJ-CD4 (clone GC92) et HF DR-GFP (clone RG37), porteurs des substrats de réparation pour la RH et le EJ, sont issus de la lignée HF, il est probable que la déplétion transitoire de PARP2 n'affecte pas l'activité de PARP1 dans ces lignées. Ces données mettent donc en lumière un rôle spécifique de PARP2 dans la régulation de la réparation des CDBs de l'ADN, qui est indépendant de son activité enzymatique.

3. L'activité de PARP2 au sein de la réparation de l'ADN

Il est maintenant bien caractérisé que PARP2 est recruté aux sites de dommages de l'ADN, ce qui contribue à stimuler localement son activité de synthèse de PAR (Kutuzov et al., 2013a; Langelier et al., 2014a; Langelier et al., 2014b; Sukhanova et al., 2016). De plus, plusieurs études ont mis en évidence que PARP2 pouvait PARyler de nombreux acteurs de la réparation de l'ADN, les histones (Carter-O'Connell and Cohen, 2015; Carter-O'Connell et al., 2014; Gibson et al., 2016), ou encore les extrémités d'ADN endommagées *in vitro* (Talhaoui et al., 2016). Cependant, l'implication de l'activité de PARP2 dans la promotion de la survie cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN n'a jusqu'ici jamais été déterminée.

Dans le premier article présenté dans ce manuscrit, nous avons observé que PARP2 contribue à assurer la survie cellulaire en réponse aux radiations ionisantes quel que soit son apport à l'activité PARP globale, pouvant suggérer que l'activité de PARP2 n'est pas un facteur clé dans ce contexte

(Boudra et al., 2015). Ces données pourraient donc insinuer que PARP2 agit dans la réponse aux dommages de l'ADN induits par irradiation, indépendamment de son activité enzymatique.

Dans la seconde étude qui est présentée, nous avons vu que la sensibilité à la bléomycine de la lignée HF EJ-CD4, déplétée pour PARP2, est complémentée lors de la réintroduction de la forme sauvage ou de la forme mutante inactive de PARP2 E545A. Ce mutant est similaire au mutant E988A de PARP1, en cela qu'il remplace le glutamate du motif H-Y-E par une alanine. Il a été décrit que ce mutant diminue la capacité de PARP1 à allonger les chaînes d'ADP-ribose d'un facteur 2000 (Marsischky et al., 1995). De même, la capacité à initier la formation des PAR est aussi dramatiquement réduite dans ce mutant. Un effet similaire, sur l'initiation et l'élongation des chaînes de PAR est donc attendu pour le mutant PARP2 E545A. Ce résultat indique donc clairement que l'activité de PARP2 n'est pas requise pour promouvoir la survie cellulaire en réponse aux CSBs et aux CDBs de l'ADN induites par la bléomycine (Chen et al., 2008a), dans la lignée HF EJ-CD4. Ces résultats suggèrent donc fortement que la sensibilité à la bléomycine des cellules déplétées pour PARP2 est la résultante du défaut dans les voies de réparation des CDBs de l'ADN, qui est aussi indépendant de l'activité de PARP2.

A l'avenir, il sera important de déterminer quelles fonctions de PARP2 dans le maintien de la stabilité de l'ADN sont dépendantes ou non de son activité, dans un contexte où les inhibiteurs de PARP sont utilisés en clinique. Il serait donc essentiel de déterminer la viabilité des cellules complémentées avec le mutant catalytique de PARP2 E545A, en réponse à l'induction de dommage par différents agents génotoxiques comme le MMS, l'H2O2 ou les radiations ionisantes.

4. Le lien entre PARP2 et 53BP1

53BP1 est une protéine essentielle dans le choix des voies de la réparation de l'ADN, en permettant de limiter l'initiation de la résection des extrémités d'ADN (Bunting et al., 2010). Ainsi, nous avons montré que la déplétion de 53BP1 stimule les voies de la RH, du SSA et du Alt-EJ, qui dépendent de la résection, et inhibe la voie du C-EJ. Ces fonctions étant largement opposées à celle de PARP2, un rôle antagoniste des deux protéines dans la régulation de l'initiation de la résection a donc été suggéré. On peut cependant noter que lors de l'analyse des points de jonctions post-

réparation, nous n'avons pas observé la présence de longues délétions, une caractéristique de la perte de 53BP1 (Grabarz et al., 2013; Guirouilh-Barbat et al., 2016). L'analyse des séquences aux points de jonction nécessite une étape d'amplification des séquences par PCR, suivie d'une étape de purification des produits de PCR sur gel. De part ces contraintes techniques, deux raisons pourraient expliquer cette observation (1) la présence de délétions trop longues pour permettre la capture des évènements de réparation par PCR (2) une exclusion involontaire des longues délétions lors de la purification sur gel des produits de PCR. Il est ainsi possible que nous ayons sous-estimé l'effet de la déplétion de 53BP1 sur la formation de longues délétions et donc sur l'efficacité de réparation par la voie du C-EJ.

L'une des observations majeures qui a été faite au cours de mon travail de thèse montre que PARP2 affecte l'accumulation de 53BP1 aux sites de dommages de l'ADN induits soit par microirradiation laser, soit après un traitement de deux heures à la bléomycine. De plus, la déplétion de 53BP1 restaure l'efficacité des voies de la réparation des cellules déficientes pour PARP2. Ceci suggère donc fortement que l'accumulation excessive de 53BP1 est responsable des défauts de la réparation, observés en absence de PARP2.

Comment PARP2 pourrait réguler l'accumulation de 53BP1 aux sites de dommages de l'ADN est une question qui reste pour le moment en suspens. Une diminution du recrutement de 53BP1 ou de sa persistance aux sites de dommages de l'ADN en absence de PARP2, pourrait avoir les mêmes conséquences. Doit-on donc parler d'une altération de l'accumulation ou de la dissociation de 53BP1 en absence de PARP2 ? La protéine 53BP1 est recrutée en l'espace de quelques minutes aux sites de dommages de l'ADN en phase G1, S et G2 du cycle cellulaire (Bakr et al., 2016; Isono et al., 2017). En revanche, le recrutement de 53BP1 est inhibé par phosphorylation durant la mitose pour prévenir la formation de fusions télomères-télomères (Orthwein et al., 2014). Alors que 53BP1 et son partenaire RIF1 persistent aux sites de dommages en phase G1 du cycle cellulaire, 53BP1 et RIF1 sont dissociés rapidement en phase S et G2 pour permettre la résection des extrémités (Bakr et al., 2016). Cette dissociation de 53BP1 et de RIF1 est dépendante de BRCA1. En revanche, l'effet de la déplétion de PARP2 sur la quantité relative de protéine 53BP1 aux sites de dommages induits par microirradiation laser s'observe dès l'initiation du recrutement de 53BP1. Cette observation nous a donc conduit à proposer un effet de PARP2 sur la phase d'accumulation initiale de 53BP1 aux dommages. Ainsi, si la phase de dissociation de 53BP1 est définie comme

l'action de BRCA1, alors PARP2 affecte l'accumulation et non la dissociation de 53BP1. Ces données suggèrent donc un rôle différent de PARP2 sur 53BP1, que ceux précédemment décrits pour BRCA1. Néanmoins, nous ne pouvons pas totalement exclure que PARP2 affecte le turnover local de 53BP1 aux sites de dommages en faveur d'une dissociation. Pour conclure quant aux rôles respectifs de PARP2 et de BRCA1, il serait déterminant de connaître les cinétiques d'association mais aussi de dissociation de 53BP1 en fonction des différentes phases du cycle cellulaire, en absence de PARP2 et/ou de BRCA1. Ceci pourrait être déterminé en combinant des approches de microirradiation laser et d'immunofluorescence pour suivre la dynamique de recrutement et de la dissociation de 53BP1. Ainsi, l'observation que BRCA1 et PARP2 sont épistatiques dans la promotion de la RH, du SSA et du Alt-EJ suggère qu'une action combinée de ces deux protéines est requise à deux niveaux distincts. Ces données suggèrent donc que la déplétion de 53BP1 devrait restaurer partiellement la viabilité des cellules déficientes pour PARP2 comme cela a été décrit pour BRCA1 (Bouwman et al., 2010; Bunting et al., 2010).

L'observation que l'effet de PARP2 sur l'efficacité de réparation des CDBs par la RH et le EJ est indépendant de son activité, mais dépendant de 53BP1, suggère que le recrutement de 53BP1 est aussi indépendant de l'activité enzymatique de PARP2. Cette observation n'est pas contradictoire avec un rôle local de PARP2, puisque le recrutement de PARP2 aux sites de dommages de l'ADN n'est pas dépendant de son activité (Riccio et al., 2016 et nos données). Nous avons donc envisagé que PARP2 pouvait moduler la présence de 53BP1 à la chromatine endommagée en interagissant avec des acteurs impliqués dans le recrutement de 53BP1. Tout d'abord, sachant que les foyers 53BP1 ne sont pas résistants à un traitement par un inhibiteur du protéasome dans les cellules déplétées pour PARP2, cela suggère indirectement que la voie RNF8-RNF168 n'est pas suractivée en absence de PARP2 (voir figure 28). L'utilisation d'un anticorps spécifique de H2AK15ub serait importante pour confirmer cette observation. En revanche, nos analyses préliminaires ont permis de mettre en évidence une interaction entre la protéine PARP2 et la protéine RIF1, une protéine qui est importante pour assurer la reconnaissance de H4K20me2 par le domaine Tudor de 53BP1 (Drané et al., 2017 et figure 29). En effet, l'interaction de RIF1 avec la protéine 53BP1 soluble, abolit l'interaction entre 53BP1 et la protéine TIRR qui masque le domaine Tudor de 53BP1. Cependant, il a été déterminé que la déplétion de TIRR diminue la stabilité de 53BP1 ; or, nous n'avons pas observé de diminution de l'expression de 53BP1 en absence de PARP2. Ainsi, ce mécanisme n'est probablement pas impliqué dans le défaut

d'accumulation de 53BP1, observé en l'absence de PARP2. De plus, la déplétion de PARP2 n'affecte pas la formation des foyers RIF1 (Figure 30). Cette dernière observation explique d'ailleurs probablement pourquoi la déplétion de RIF1 ne restaure que très partiellement l'efficacité de la RH et du EJ des cellules déplétées pour PARP2 et suggère que RIF1 n'est pas la cible par laquelle PARP2 modère le recrutement de 53BP1.L'interaction entre RIF1 et PARP2 pourrait donc jouer un rôle dans d'autres processus cellulaires comme durant la maintenance de l'intégrité des télomères, où RIF1 et PARP2 sont impliqués (Dan et al., 2014; Dantzer et al., 2004; Shi et al., 2013).

Une seconde hypothèse pour expliquer comment PARP2 régule le recrutement de 53BP1 pourrait être un rôle transcriptionnel indirect de PARP2. En effet, il a été établi que PARP2 pouvait réguler la transcription indépendamment de son activité enzymatique (Liang et al., 2013). Cependant, nous n'avons observé de variations de l'expression d'aucune des protéines que nous avons étudiées, et l'observation du transcriptome d'une lignée déplétée pour PARP2 ou des bases de données d'expression n'a pas fait apparaitre de candidat potentiel à la régulation du recrutement de 53BP1 (Szántó et al., 2014).

Une dernière hypothèse serait que PARP2 module localement la structure de la chromatine, facilitant ainsi l'accumulation de 53BP1. En effet, PARP2 est recruté plus précocement que 53BP1 aux sites de dommages de l'ADN, indépendamment de son activité enzymatique. Pour confirmer cette hypothèse d'un effet local de PARP2, il serait essentiel de complémenter des cellules déficientes pour PARP2 avec des mutants du domaine WGR de PARP2 qui sont déficients dans leur recrutement aux sites de dommages de l'ADN, comme les formes $PARP2^{N116A}$ ou $PARP2^{Y188F}$ (Riccio et al., 2016). Néanmoins, même si le recrutement de la forme fusionnée à la GFP de PARP2 est facilement détectable en réponse aux dommages induits par microirradiation laser, nous avons été dans l'impossibilité de détecter la formation de foyers PARP2 par immunofluorescence, après un traitement avec des agents génotoxiques. Cette restriction technique nous a malheureusement limité dans la réponse à plusieurs questions importantes :

- La protéine PARP2 est-elle recrutée directement au niveau des CDBs de l'ADN, et si oui, dans quelle proportion et dans quelle phase du cycle cellulaire ?
- PARP2 colocalise t-il avec les acteurs de la résection en réponse aux dommages de l'ADN ?

- Est-ce que PARP2 colocalise avec 53BP1, ou inversement sont-ils mutuellement exclusifs comme ce qui est décrit pour BRCA1 et 53BP1 ?

La réponse à ces questions pourrait cependant être partiellement obtenue en utilisant des approches d'immunoprécipitation de chromatine.

Il est aussi très intéressant d'évaluer les conséquences de cette hyper-accumulation de 53BP1, qui est responsable des défauts de résection des extrémités observés en absence de PARP2.

Alors que PARP2 n'affecte pas l'efficacité globale du CSR, 53BP1 est essentiel au cours de ce processus (Robert et al., 2009; Ward et al., 2004). Cependant, l'inverse n'est pas vrai, puisque la surexpression de 53BP1 n'affecte pas l'efficacité du CSR (Zong et al., 2015). Il est donc peu probable qu'une l'accumulation excessive de 53BP1 à la chromatine affecte l'efficacité du CSR. Ceci pourrait expliquer pourquoi la déplétion de PARP2 n'affecte pas l'efficacité du CSR chez la souris.

Sachant que l'absence de PARP2 est associée avec une augmentation de la fréquence des translocations IgH/c-Myc au cours du CSR chez la souris, il est intéressant de se demander si l'augmentation de l'efficacité du C-EJ que nous avons décrite pourrait expliquer ce phénomène (Robert et al., 2009) Les cellules déficientes pour Ku70, Ku80, XRCC4 et pour l'ADN ligase 4 conservent une efficacité du CSR de l'ordre de 50% par la voie du Alt-EJ, suggérant donc que l'origine de ces translocations chez la souris vient de l'action du Alt-EJ (Boboila et al., 2010; Wang et al., 2009b; Yan et al., 2007). De même, en absence de Ku70, la fréquence des translocations est augmentée de façon dépendante de CtIP chez la souris, impliquant la voie du Alt-EJ (Lee-Theilen et al., 2011; Weinstock et al., 2007; Zhang and Jasin, 2011). Concernant les translocations IgH/c-myc, leur fréquence n'est pas affectée par la déplétion de 53BP1, alors que la combinaison de la déficience en XRCC4 et P53 est associée avec la formation de lymphomes B porteurs de translocations entre les locus IgH et c-Myc (Ramiro et al., 2006; Wang et al., 2008). Ces données indiquent donc qu'il est peu probable que l'augmentation de la fréquence des translocations au cours du CSR chez la souris en absence de PARP2 soit causée par l'augmentation de l'efficacité du C-EJ.

Cependant, il est important de souligner que chez l'homme, la formation des translocations dépendent du C-EJ et non du Alt-EJ (Bhargava et al., 2017; Ghezraoui et al., 2014). De plus, l'absence de PARP2 est associée avec une augmentation importante des cassures chromosomiques, des micronoyaux, et les anaphases issues de cellules déplétées pour PARP2, présentent de nombreux défauts de ségrégations chromosomiques après un traitement avec un agent alkylant (Dantzer et al., 2006; Menissier de Murcia et al., 2003). PARP2 est donc important pour assurer la stabilité du génome, et il serait très intéressant de déterminer si son activité enzymatique est requise à ce niveau, dans les cellules humaines en particulier.

De façon intéressante, alors que la déplétion de 53BP1 est associée avec une augmentation de la fréquence des délétions de longues tailles lorsque les deux CDBs sont éloignées, l'induction par I-Sce1 de deux CDBs proches de 34pb en absence de 53BP1, n'augmente pas la taille des délétions (Guirouilh-Barbat et al., 2016). De même, au cours de la recombinaison V(D)J, 53BP1 stimule uniquement le rapprochement de séquences éloignées (Difilippantonio et al., 2008). Ceci suggère que la protection des extrémités par 53BP1 n'est pas requise lorsque les extrémités sont suffisamment proches. Dans ce contexte, il est possible que l'action de Ku soit suffisante pour protéger et maintenir et protéger les extrémités proches l'une de l'autre. A l'inverse, lorsque les extrémités sont éloignées, l'action de 53BP1 et de ces partenaires protège les extrémités et favorise aussi peut-être leur rapprochement. L'obtention récente de la structure du domaine N-terminale de Rif1p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* va dans le sens d'une protection directe de l'extrémité (Mattarocci et al., 2017). Ainsi, il serait intéressant de déterminer si PARP2 a un effet sur la jonction de deux CDBs proches l'une de l'autre. Certaines de nos données préliminaires pourraient indiquer que PARP2 n'est pas requis dans ce contexte.

L'absence de PARP2 est aussi associée avec la présence d'un stress réplicatif chronique dans les érythroblastes murins et PARP2 a été identifié dans un crible de cellules humaines ayant pour objectif l'identification de gènes impliqués dans la réponse à un stress réplicatif (Farres et al., 2015; Kavanaugh et al., 2015). Il serait donc intéressant de déterminer si le rôle de PARP2 dans la promotion de la résection pourrait expliquer ces phénotypes. Le stress réplicatif chronique, spécifique des érythroblastes déficients pour PARP2, cause une anémie, ce qui est par ailleurs l'un des effets secondaires majeurs des inhibiteurs de PARP utilisés en clinique. Ceci pourrait suggérer que l'inhibition de l'activité enzymatique de PARP2 spécifiquement serait peut-être à l'origine de

certains des effets secondaires des inhibiteurs de PARP. Une explication possible est que PARP2 pourrait prévenir l'émergence d'un stress réplicatif chez la souris et chez l'homme de façon dépendante de son activité enzymatique. Le rôle de PARP2 que nous avons identifié dans la régulation du choix des voies de la réparation des CDBs de l'ADN est indépendant de l'activité de PARP2. Il est donc probable que le rôle de PARP2 dans la réparation des CDBs et le rôle de PARP2 en réponse à un stress réplicatif soient des fonctions distinctes. Finalement, le rôle additionnel de PARP2 dans la promotion de la RH au niveau des fourches de réplication arrêtées, pourrait être en cause pour expliquer l'apparition d'un stress réplicatif dans les cellules déplétées pour PARP2 (Bryant et al., 2009). Pourtant, seule la déplétion de PARP2 cause une anémie chez la souris (Farres et al., 2015), alors que PARP1 et PARP2 ont tous deux été impliqués dans la promotion de la RH au niveau de fourches de réplication (Bryant et al., 2009). Un autre rôle non identifié et spécifique de PARP2 rentre donc probablement en jeu lors de l'hématopoïèse murine. Ceci pourrait expliquer pourquoi seule la double déficience de PARP2 et de P21, et non celle de PARP1 et de P21, est associée avec une mortalité embryonnaire chez la souris (Farres et al., 2015), mais aussi pourquoi seul PARP2, et non PARP1, a été identifié dans le crible cité précédemment (Kavanaugh et al., 2015). Ces données suggèrent donc un rôle triple de PARP2 :

- Un rôle spécifique de PARP2, indépendant de son activité, dans l'inhibition du recrutement de 53BP1 aux sites de dommages de l'ADN
- Un rôle de l'activité enzymatique de PARP1 et de PARP2 dans la promotion de la RH au niveau des fourches de réplication
- Un rôle spécifique de l'activité enzymatique de PARP2 dans la prévention du stress réplicatif

Finalement, 53BP1 est aussi important pour faciliter l'activation optimale de la kinase ATM en réponse aux dommages de l'ADN, stimulant ainsi l'activation du checkpoint G2/M par l'intermédiaire de CHK2 (Chaturvedi et al., 1999; DiTullio et al., 2002; Lee et al., 2010; Matsuoka et al., 1998; Shibata et al., 2010). L'accumulation importante de 53BP1 à la chromatine en absence de PARP2 pourrait alors stimuler l'activation d'ATM, et ainsi expliquer l'activation du checkpoint G2/M observé dans les cellules déficientes pour PARP2 (Farres et al., 2015; Liang et al., 2013). A l'inverse, le défaut dans l'initiation de la résection pourrait affecter la voie ATR-CHK1 dont l'activité dépend de l'étendue de la résection aux sites de dommages de l'ADN (Kousholt et al.,

2012; Peterson et al., 2013). Il serait ainsi très intéressant de comparer le niveau de phosphorylation dans le temps des substrats d'ATM et d'ATR, en réponse à différents agents génotoxiques et dans des cellules déplétées pour PARP2.

5. Le lien entre PARP2 et BRCA1

BRCA1 joue des rôles multiples et parfois contradictoires au sein de la réparation des CDBs de l'ADN. En phase S et G2, BRCA1 stimule l'initiation de la résection dépendante de CtIP, en éliminant la barrière de la résection dépendante de 53BP1 et de ses effecteurs, facilitant ainsi la RH (Bunting et al., 2010; Densham et al., 2016; Polato et al., 2014; Zhang et al., 2016). Ce rôle de BRCA1 dans l'initiation de la résection facilite aussi les voies du SSA et du Alt-EJ (Stark et al., 2004b; Zhong et al., 2002). BRCA1 permet aussi l'accumulation de BRCA2 aux sites de dommages de l'ADN par l'intermédiaire de PALB2 (Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2009b). Cette fonction de BRCA1 stimule la RH au détriment de la voie du SSA (Anantha et al., 2017). Etonnamment, il semblerait que le recrutement précoce de BRCA1 soit dépendant de son interaction avec Ku80 (Wei et al., 2008). Ceci pourrait aussi être dépendant de PARP1, qui non seulement interagit avec Ku80, mais qui est aussi responsable de l'accumulation précoce de BRCA1 (Li and Yu, 2013). L'interaction entre BRCA1 et Ku80, pourrait stabiliser Ku80 aux extrémités d'ADN en phase G1 du cycle cellulaire, et ainsi favoriser la voie du C-EJ (Jiang et al., 2013). Ceci, alors même qu'en phase G1 du cycle cellulaire, le recrutement de BRCA1 est contrecarré par la voie 53BP1-RIF1 (Escribano-Diaz et al., 2013; Feng et al., 2015). Finalement, il a été proposé que BRCA1 facilite aussi la voie du Alt-EJ en phase G1 du cycle cellulaire (Biehs et al., 2017). Ces données suggèrent donc que BRCA1 est probablement impliqué dans toutes les voies de la réparation des CDBs de l'AD, et que ses fonctions sont régulées au cours du cycle cellulaire et au sein de complexes protéiques différents. Notre étude indique que la déplétion de BRCA1 affecte l'efficacité de la RH, du SSA et du Alt-EJ, ce qui est en accord avec le rôle décrit de BRCA1 dans l'initiation de la résection. Sachant que la déplétion de PARP2 n'affecte pas l'efficacité de ces voies de la réparation dans des cellules déplétées pour BRCA1, il est probable que ces deux protéines coopèrent pour assurer l'initiation de la résection. Il est donc tentant de postuler que PARP2 et BRCA1 ont un rôle commun dans l'inhibition des fonctions dépendantes

de 53BP1, permettant ainsi l'initiation de la résection. Cette hypothèse est renforcée par l'observation que PARP2 n'affecte pas plus la sensibilité à la bléomycine des cellules déficientes pour BRCA1. En revanche, la sensibilité beaucoup plus importante des cellules déplétées pour BRCA1 provient probablement des rôles multiples de BRCA1 dans la réparation des CDBSs de l'ADN qui sont cités ci-dessus (Bunting et al., 2012; Jiang et al., 2013; Sy et al., 2009; Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2009b).

En effet, alors qu'en absence de PARP2, la voie du C-EJ est stimulée de façon dépendante de 53BP1, l'efficacité de cette dernière est diminuée en absence de BRCA1, indépendamment de 53BP1 (Hu et al., 2014). Cette fonction de BRCA1 dans le C-EJ pourrait correspondre à ce qui a été décrit dans la stabilisation de Ku80 en phase G1 du cycle cellulaire (Jiang et al., 2013). Ceci pourrait donc expliquer pourquoi BRCA1, en agissant sur Ku80, et PARP2, en agissant sur 53BP1, semblent jouer des rôles antagonistes dans la régulation du C-EJ. Cette interprétation reste cependant à caution au regard des rôles multiples de BRCA1 au sein de la réparation des CDBs de l'ADN. Il serait donc essentiel de posséder des mutants séparation de fonction de BRCA1 pour disséquer en détail la relation entre BRCA1 et PARP2.

Sur la base de l'ensemble de mes résultats présentés dans l'article 2, nous proposons donc le modèle suivant (Figure 31) :

L'absence de PARP2 affecte l'efficacité de la RH, du SSA et du Alt-EJ et stimule l'efficacité du C-EJ. Ces données suggèrent un défaut de l'initiation de la résection qui est l'étape commune des voies du HR, du SSA et du Alt-EJ. En effet, nous avons observé que PARP2 stimule la formation de l'ADN simple-brin en réponse aux dommages de l'ADN, ce qui est aussi démontré par la diminution de l'accumulation des protéines RPA et RAD51 aux sites de dommages de l'ADN, en absence de PARP2. CtIP est une endonucléase essentielle à l'activation du complexe MRN, et ainsi à l'initiation de la résection (Sartori et al., 2007). Nous démontrons que PARP2 et CtIP sont épistatiques dans la promotion du HR, du SSA et du Alt-EJ, indiquant que les deux protéines coopèrent dans l'initiation de la résection. L'activation de CtIP requière l'action de BRCA1, pour éliminer la barrière tenue par 53BP1 et ses effecteurs (Polato et al., 2014). Sachant que PARP2 limite l'accumulation de 53BP1 aux sites de dommages de l'ADN, et que la déplétion de 53BP1 restaure l'efficacité des voies de la réparation en absence de PARP2, nous proposons

que PARP2 soit en amont de 53BP1 pour stimuler la résection dépendante de CtIP et du complexe MRN. PARP2 coopère aussi avec BRCA1 pour stimuler les voies de la réparation qui dépendent de la résection, indiquant que PARP2 et BRCA1 coopèrent probablement pour éliminer la barrière qui dépend de 53BP1. Finalement, nos données mettent aussi en évidence un rôle de BRCA1 dans la voie de jonction des extrémités qui est indépendante de BRCA1.

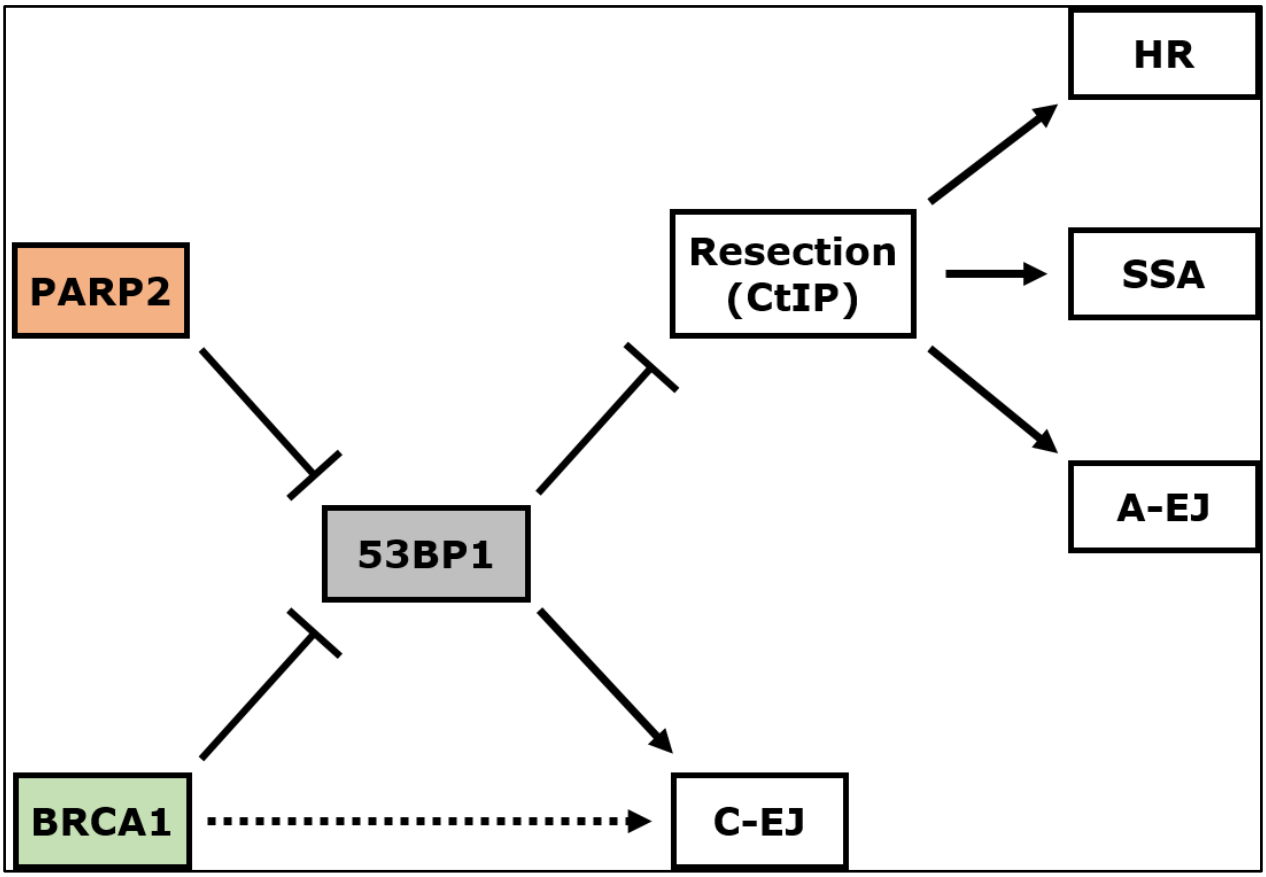


Figure 31 : Modèle expliquant la contribution de PARP2 dans la régulation du choix des voies de la réparation des cassures double-brins de l'ADN.

Ces résultats mettent en lumière un nouveau rôle de PARP2 dans la régulation des voies de la réparation, qui est indépendant de son activité enzymatique. De plus, nous avons observé que l'activité de PARP2 n'est pas requise pour favoriser la survie cellulaire en réponse à l'induction de dommages de l'ADN par la bléomycine. Il est donc tentant de postuler que le défaut des voies de la réparation des CDBs de l'ADN associé avec l'absence de PARP2, explique la sensibilité à la

bléomycine de ces lignées cellulaires. Ceci est renforcé par l'observation que la déplétion de PARP2 n'aggrave pas la sensibilité d'une lignée déficiente pour BRCA1. A l'avenir, il sera essentiel de déterminer comment cette fonction de PARP2 contribue au maintien de la stabilité du génome. En particulier, il serait intéressant de déterminer si les aberrations chromosomiques qui sont observées dans les cellules n'exprimant pas PARP2 (Dantzer et al., 2006; Farres et al., 2015; Menissier de Murcia et al., 2003), sont dépendantes de la présence de 53BP1.

6. PARP2 et cancer

De nombreuses études ont identifié que la région du chromosome 14 (14q11.2), contenant le gène *PARP2*, est fréquemment amplifiée dans plusieurs types tumoraux (Abujiang et al., 1998; Ambatipudi et al., 2011; Kawasaki et al., 2007; Park et al., 2007; Walsh et al., 2014; Yuen et al., 2014) (http://portals.broadinstitute.org/tcga/gistic/browseGisticByGene). On retrouve aussi des délétions, des translocations ou des inversions de cette région dans certains lymphomes et leucémies, indiquant que cette région particulière du chromosome 14 est fortement recombinogène (Bjorkqvist et al., 1999; Croce et al., 1985; McCaw et al., 1975). De plus, l'expression de PARP2 semble être associée avec un mauvais pronostic dans plusieurs modèles tumoraux (Colicchia et al., 2017; Gennari et al., 2009; Lin et al., 2016). L'expression de PARP2 est aussi induite en réponse à la mitomycine C dans une lignée de cancer du col de l'utérus, et par les radiations ou la doxorubicine dans un modèle de carcinome hépatique (Kang et al., 2010; Lin et al., 2016). Finalement, dans une cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein, un SNP présent dans la séquence intergénique de *PARP2* (rs878156) a été identifié comme associé avec une réponse différentielle à la chimiothérapie, ainsi qu'avec un risque accru de développer un cancer (Popanda et al., 2013; Seibold et al., 2015). Des études fonctionnelles seront cependant nécessaires pour déterminer si la présence de ce variant peut affecter l'expression de PARP2. Connaissant les rôles de PARP2 dans la réparation de l'ADN ainsi que dans le maintien de la stabilité du génome, l'ensemble de ces résultats suggèrent que l'expression de PARP2 facilite la survie des cellules tumorales en réponse aux traitements anticancéreux *in vivo*.

A l'avenir il sera aussi essentiel de déterminer si la surexpression de PARP2 pourrait inhiber le recrutement de 53BP1 et ainsi stimuler la résection et la RH. Si tel est le cas, il est alors possible que la surexpression de PARP2 favorise la résistance aux inhibiteurs de PARPs qui sont utilisés en

clinique Nos résultats permettant l'identification d'une nouvelle fonction de PARP2 dans la régulation du choix des voies de la réparation impliquent que la surexpression de PARP2 pourrait aussi avoir des conséquences sur la formation de réarrangements chromosomiques. Ainsi il apparaît nécessaire d'étudier l'effet de la surexpression de PARP2 sur la réponse cellulaire à des stress génotoxiques et sur le maintien de la stabilité du génome.

Cependant, il est important de noter que la région 14q11.2 contient aussi de nombreux autres gènes dont certains sont impliqués dans la régulation de la stabilité génétique (APE1) ou encore de l'apoptose (BCL2L : Bcl-2-like protein 2), et dont la surexpression pourrait aussi favoriser la survie des cellules tumorales. Par exemple, la surexpression de l'endonucléase APE1 est responsable d'une résistance à la chimiothérapie, et d'une progression tumorale associée avec un mauvais pronostic (Al-Attar et al., 2010; Robertson et al., 2001; Wang et al., 2004; Wang et al., 2009a; Xie et al., 2014). Il est aussi intéressant de noter que PARP2 est exprimé à partir d'un promoteur bidirectionnel qui contrôle aussi l'expression de la ribonucléase H1 (RNAse H1) (Amé et al., 2001). Cette dernière protéine est impliquée au cours de la réplication, de la réparation de l'ADN ainsi que de la transcription (Amon and Koshland, 2016; Tannous et al., 2015; Wu et al., 2013). Il serait intéressant de déterminer si l'expression de ces deux protéines est corrélée, en particulier en réponse à un stress génotoxique.

7. Le lien entre PARP2 et XRCC1

XRCC1 est une protéine centrale au sein du BER. Le recrutement de XRCC1 est largement dépendant des PAR et de son interaction avec PARP1, mais est aussi partiellement dépendant de son interaction avec les glycosylases (Caldecott et al., 1996a; Campalans et al., 2005; Campalans et al., 2015; Masson et al., 1998a). Il a été historiquement décrit que l'activité de PARP1, et non celle de PARP2, soit responsable de l'accumulation de XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN dans les MEF issues des souris KO pour PARP1 et PARP2 (Mortusewicz et al., 2007). En revanche, PARP2, et non PARP1, participe à la régulation du turnover de XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN dans ces cellules (Mortusewicz et al., 2007). Cependant, l'observation d'un recrutement résiduel de XRCC1 dans une lignée HeLa ou dans les MEF n'exprimant pas PARP1, indique que PARP1 et son activité ne sont pas les seuls moteurs du recrutement de XRCC1 aux sites de

dommages de l'ADN. Par ailleurs, nous avons observé qu'un inhibiteur de PARP inhibe une partie du recrutement de XRCC1 dans la lignée HeLa n'exprimant pas PARP1, suggérant que PARP2 participe aussi au recrutement de XRCC1 en absence de PARP1. De plus, nous avons vu que PARP2 peut moduler l'activité de PARP1, et ainsi affecter le recrutement de XRCC1 (Boudra et al., 2015). Ces données suggèrent que PARP2 peut contribuer au recrutement de XRCC1 dans certains contextes particuliers. Ainsi, dans la lignée RPE-1, il semblerait que PARP1 et PARP2 soient tous deux requis pour assurer le recrutement de XRCC1 ainsi que de la protéine PNKP en réponse aux dommages induits par un traitement au H2O2 (Hanzlikova et al., 2017). Une contribution de PARP3 à ce niveau a cependant été écartée. L'ensemble de ces résultats indiquent donc que la contribution de PARP2 au recrutement de XRCC1 n'est pas négligeable et dépend probablement du modèle cellulaire utilisé. Ainsi, PARP2 pourrait être un acteur majeur du BER au sens large du terme, en modulant les fonctions de XRCC1.

8. Les modifications post-traductionnelles de XRCC1 par phosphorylation

XRCC1 est une protéine essentielle lors du BER, ne possédant pas d'activité enzymatique connue et dont les fonctions sont largement médiées par ses modifications post-traductionnelles de diverses natures. Dans la dernière étude présentée dans ce manuscrit, nous avons mis en évidence pour la première fois que l'interdomaine 1 et le domaine BRCT1 sont phosphorylés *in vitro* sur huit positions par la kinase CDK5, et que parmi ces positions, cinq sont effectivement phosphorylées *in vivo*. Il est cependant possible que cette différence implique une phosphorylation de XRCC1 par CDK5 en réponse à un stimulus particulier. En effet, contrairement aux autres CDKs dont l'activité est essentiellement dépendante des cyclines, CDK5 est majoritaire activée par trois partenaires protéiques activateurs nommés p39, p35 et p25 (Pour revue : Shupp et al., 2017). Ainsi, l'activité de CDK5 n'est pas dépendante du cycle cellulaire, suggérant que les phosphorylations que nous avons identifiées ne le sont pas non plus. L'activité de CDK5 a été impliqué dans de multiples processus biologiques : au niveau du système nerveux central (Anne et al., 2007; Fang et al., 2011; Ohshima et al., 1996; Shea et al., 2004), du système immunitaire (Dorand et al., 2016), vasculaire (Herzog et al., 2016), lymphatique (Liebl, 2015), ou encore dans la progression tumorale

(Dorand et al., 2016; Grant et al., 2015; Pozo et al., 2013; Strock et al., 2006). Il est d'ailleurs intéressant de noter que comme pour XRCC1, les cellules déficientes pour CDK5 sont hypersensibles aux inhibiteurs de PARP, suggérant ainsi un rôle de CDK5 dans la prise en charge des dommages de l'ADN (Strom et al., 2011; Turner et al., 2008). Dans les neurones, il a par exemple été déterminé que CDK5 phosphoryle la thréonine 232 d'APE1, ce qui inhibe son activité endonucléase (Huang et al., 2010). De plus, mon ancien laboratoire d'accueil a mis en évidence que CDK5 pouvait phosphoryler la protéine RPA2 sur 3 positions *in vitro,* ce qui pourrait affecter la réponse cellulaire à un stress réplicatif (Chiker et al., 2015). De même, CDK5 semble contrôler l'activité de PARP1 par phosphorylation (Bolin et al., 2012). Ainsi, les lignées déficientes pour CDK5 sont plus sensibles aux inhibiteurs de PARP, aux radiations ionisantes, à l'hydroxyurée ou aux analogues de nucléotides (Bolin et al., 2012; Chiker et al., 2015). Nous établissons donc ici une nouvelle fonction de CDK5 dans la régulation des fonctions de XRCC1. Il est cependant important de noter que les complexes CDK1-cycline B et CDK2-cycline A sont aussi capables de phosphoryler XRCC1 *in vitro,* bien que le niveau de phosphorylation observé soit plus faible. De même, des cribles par spectrométrie de masse suggèrent que la kinase EGF (Epidermal growth factor) ou encore certaines MAPK (Mitogen-activated protein kinases) phosphorylent XRCC1 en position 241, 266 et 268 (Olsen et al., 2006; Pan et al., 2009). Il sera ainsi intéressant de déterminer si l'interdomaine 1 de XRCC1 est effectivement non phosphorylé dans une lignée n'exprimant pas CDK5. Cependant, une compensation par l'activité des autres CDKs pourrait masquer la contribution de CDK5. Pour pallier à cet inconvénient, il serait également nécessaire de comparer les profils de phosphorylation de XRCC1 dans des cellules traitées soit avec un inhibiteur de CDK à large spectre soit avec des inhibiteurs spécifiques de certaines CDKs.

In vivo, la phosphorylation du domaine BRCT1 en position 367, qui a été identifié *in vitro*, n'a pas été détectée. Cette position est cependant essentielle dans la reconnaissance des PAR puisque le recrutement des mutants XRCC1^{367A} et XRCC1^{11A} à la chromatine ou aux sites de dommages induits par microirradiation laser est fortement réduit. De même, ces mutants ne complémentent que partiellement la survie des cellules EM9 en réponse à une exposition au MMS. Sachant que ce résidu ne fait pas partie du domaine PBM de XRCC1, cette information suggère par ailleurs que l'intégralité du domaine BRCT1 soit impliqué dans la reconnaissance des PAR (Li et al., 2013; Pleschke et al., 2000a). Ainsi, la sensibilité profonde du mutant XRCC1^{367D} au MMS pourrait potentiellement s'expliquer par une déstructuration du domaine BRCT1, abolissant ainsi

totalement la reconnaissance des PAR. Une explication similaire a été apportée pour expliquer les effets du mutant XRCC1^{L360D} à la fois sur le recrutement de XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN, ainsi que dans la survie cellulaire en réponse au MMS (Okano et al., 2003; Taylor et al., 2002). Il a été décrit que le mutant XRCC1^{L360D} n'affecte pas l'interaction de XRCC1 avec la glycosylase OGG1, ainsi que le recrutement de XRCC1 aux sites de dommages de base (Campalans et al., 2013). Cependant, en présence d'un inhibiteur de PARP, le recrutement des mutants XRCC1^{367D} et XRCC1^{L360D} est toujours significativement plus faible que celui de la protéine sauvage, indiquant un défaut du recrutement indépendant des PAR. Il est ainsi possible que ces mutants présentent donc un défaut dans leur recrutement aux sites de dommages de bases. En effet, cette région est critique pour assurer l'interaction entre XRCC1 et de multiples glycosylases. A l'inverse, il est aussi possible que ces mutations affectent l'interaction entre XRCC1 et PARP1/2.

Il a été décrit que la thréonine 284 de XRCC1 est phosphorylée par CHK2 en réponse aux dommages induits par le MMS ou le H2O2, ce qui faciliterait l'interaction entre XRCC1 et les glycosylases ainsi que la survie en réponse au MMS (Chou et al., 2008). Cependant, nous n'avons pas détecté de phosphorylation en position T284 par spectrométrie de masse *in vivo*, spontanément ou après un traitement au MMS. Un problème de sensibilité a été exclu car le peptide comprenant la position 281, qui est phosphorylée, est présent en abondance suffisante. De plus, le mutant 10A, qui est muté en position 284, ne présente pas de différence significative de survie ou d'interaction avec les glycosylases avec le mutant 9A, dans lequel l'alanine 284 a été révertée en thréonine. Nos observations suggèrent donc que l'importance de ce résidu est négligeable dans ces conditions. Ces résultats ont été à la base de l'utilisation du mutant XRCC1^{9A} dans notre étude, qui n'est pas muté en position 284 de l'interdomaine 1 et 367 du BRCT1.

L'une des observations majeures de cette étude indique que la protéine XRCC1 dans la fraction soluble est déphosphorylée dans son ensemble en réponse au MMS, alors que dans la fraction liée à la chromatine, seule la région de l'interdomaine 1 est déphosphorylée. Une contamination par des phosphatases a été exclue car de multiples inhibiteurs de kinases et phosphates ont été utilisés lors de la préparation des extraits protéiques. Ce résultat est cohérent avec l'observation par gel 2D que le pI global, (qui reflète l'état global de phosphorylation de la protéine) de la fraction chromatinienne de XRCC1 diminue 10 minutes après un traitement au H2O2 (Kubota et al., 2009).

A l'inverse, il a été décrit que la protéine XRCC1 dans la fraction chromatinienne est globalement hyperphosphorylée deux heures après un traitement transitoire d'une heure au MMS (Kubota and Horiuchi, 2003). Cette apparente contradiction peut provenir du fait que nous avons procédé à la préparation des extraits protéiques immédiatement après le traitement au MMS et non après une période de deux heures. Ces résultats pourraient suggérer que la protéine XRCC1 est initialement déphosphorylée en réponse aux dommages induits par le MMS puis phosphorylée dans un second temps. En accord avec cette proposition, il a été démontré que la phosphorylation de l'interdomaine 2 de XRCC1 par CK2 facilite la dissociation de XRCC1 (Ström et al., 2011). Lorsque les sept sites de phosphorylations de CK2 sont remplacés par des alanines, XRCC1 persiste en effet plus d'une heure aux sites de dommages induits par microirradiation laser (Wei et al., 2013). Il sera ainsi très intéressant par la suite de déterminer le pattern spatiotemporel de phosphorylation de XRCC1 en réponse aux dommages de l'ADN.

Dans cette étude, nous avons aussi déterminé que la forme non phosphorylable de XRCC1 dans son interdomaine 1 présente une affinité supérieure pour la chromatine spontanément ou en réponse aux dommages à l'ADN induits, soit par le MMS, soit par microirradiation laser. En revanche, la cinétique de dissociation de XRCC1 après microirradiation laser ne semble pas être affectée par l'absence des phosphorylations dans l'interdomaine 1. Nous montrons aussi que l'augmentation du recrutement aux sites de dommages de l'ADN des mutants $XRCC1^{10A}$ et $XRCC1^{9A}$ est dépendante des PAR synthétisés par PARP1 et PARP2. En effet, la phosphorylation de la région interdomaine 1-BRCT1 par CDK5 diminue de moitié l'affinité de ce domaine pour les PAR, alors que cela n'affecte pas la région BRCT1 seule. Cette observation explique probablement pourquoi le mutant non phosphorylable de XRCC1 présente une plus forte affinité pour PARP1, qui s'auto PARyle en réponse aux dommages de l'ADN (Pour revue : Langelier and Pascal, 2013). Cela suggère aussi que si effectivement CDK5 phosphoryle le domaine BRCT1 en position 367 *in vitro*, la phosphorylation de cette position n'affecte pas l'interaction du domaine BRCT1 avec les PAR *in vitro*, ce qui renforce l'idée d'une déstructuration du domaine BRCT1 dans les mutants $XRCC1^{367A}$ et $XRCC1^{367D}$. Ces données suggèrent donc qu'il existe un processus cellulaire permettant la déphosphorylation rapide de XRCC1 en réponse aux dommages de l'ADN qui facilite sa mobilisation aux sites de dommages. Par la suite, l'identification de la phosphatase impliquée dans ce processus sera essentielle. XRCC1 fait donc partie des protéines dont les fonctions sont régulées directement par un cycle de phosphorylation/déphosphorylation. Même si l'action des

phosphatases a souvent été associée avec la dissociation des complexes de réparation, le recrutement ou l'activation de plusieurs protéines de la réparation requière une action des phosphatases. Par exemple, l'activation de PARP1 en réponse aux dommages de l'ADN induits par la bléomycine est stimulée par la phosphatase PP5 (Serine/threonine-protein phosphatase 5) (Dong et al., 2010). De même, l'action de la phosphatase PP4C permet le recrutement de la protéine 53BP1, qui est inhibé en mitose par phosphorylation (Lee et al., 2014).

Le mécanisme par lequel les phosphorylations de l'interdomaine 1 de XRCC1 inhibent la reconnaissance des PAR par le domaine BRCT1 reste encore obscur. Sachant que les domaines BRCT sont des domaines d'interaction avec les protéines phosphorylées bien caractérisés (Yu et al., 2003), il est possible que la forme phosphorylée de l'interdomaine 1, qui est physiquement destructurée, interagisse avec le domaine BRCT1 de XRCC1. La phosphorylation de l'interdomaine 1 pourrait ainsi réduire l'affinité du domaine BRCT1 pour les PAR. Une compétition pour la liaison avec le domaine BRCT1, entre l'interdomaine 1 phosphorylé et les PAR pourrait donc réguler négativement l'interaction de XRCC1 pour les PAR. En réponse aux dommages de l'ADN, la synthèse massive de PAR ainsi que la déphosphorylation de XRCC1 assureraient donc conjointement le recrutement de XRCC1. En revanche, en l'absence de dommages à l'ADN, les phosphorylations de l'interdomaine 1 pourraient être nécessaires pour prévenir l'accumulation de XRCC1 et de ses partenaires lorsque l'activité basale de PARP1 et PARP2 est requise pour des fonctions indépendantes de la réparation de l'ADN, comme la régulation de la transcription (Gibson et al., 2016; Ke et al., 2017; Kim et al., 2004; Krishnakumar et al., 2008; Martello et al., 2016b). Alternativement, ces phosphorylations pourraient affecter la capacité des domaines BRCT1 de XRCC1 à s'homodimériser, ce qui est inhibé par la phosphorylation du domaine BRCT1 par DNA-PK en réponse aux dommages de l'ADN (Levy et al., 2006).

Nous proposons ainsi le modèle suivant : en absence de dommages de l'ADN, l'interdomaine 1 de XRCC1 est constitutivement phosphorylé par la kinase CDK5 et/ou d'autres CDKs alors que l'interdomaine 2 de XRCC1 est phosphorylé par CK2. Les phosphorylations dépendantes des CDKs inhibent l'interaction avec les PAR, alors que celles dépendantes de CK2 facilitent l'assemblage de pré-complexes de réparation contenant XRCC1, PNKP et l'aprataxine. Immédiatement en réponse aux dommages de l'ADN, l'interdomaine 1 de XRCC1 est

déphosphorylé, facilitant ainsi son recrutement. Dans un second temps, les phosphorylations dépendantes de CK2 stimulent la dissociation et le turnover de XRCC1 aux sites de dommages. Ce modèle permet de mieux appréhender comment les modifications post-traductionnelles de XRCC1 régulent toutes les étapes de la dynamique de XRCC1.

Il est cependant également à noter que la substitution par des alanines, des sérines et des thréonines phosphorylées par CDK5, n'affecte pas la survie cellulaire en réponse au MMS dans une lignée de cellules de hamster chinois. Ceci indique que l'augmentation de l'affinité pour les PAR de ce mutant n'affecte pas la sensibilité aux dommages de l'ADN induits par un agent alkylant. En effet, ce mutant mime probablement un processus cellulaire qui est normalement induit par une phosphatase en réponse aux dommages. De plus, il apparait que la cinétique de dissociation de la protéine XRCC1 phosphomutante ne soit pas affectée, écartant ainsi l'hypothèse d'un trapping aux sites de dommages de la protéine mutante 9A. Néanmoins, lorsque de multiples dommages de l'ADN sont induits, il est probable que la quantité de protéine XRCC1 recrutée doive être fermement contrôlée, pour assurer la réparation optimale à tous les sites de dommages. L'introduction des protéines $XRCC1^{9A}$ ou $XRCC1^{10A}$ complémente la sensibilité au MMS, mais pourrait donc en revanche affecter la cinétique de réparation des dommages, ainsi que la fidélité de la réparation. Par exemple, alors que les phosphorylations de l'interdomaine 2 de XRCC1 par CK2 stimule la dissociation de XRCC1 (Ström et al., 2011; Wei et al., 2013), ainsi que l'interaction avec les protéines PNKP et aprataxine, la mutation de ces sites de phosphorylation n'affecte pas la survie cellulaire (Loizou et al., 2004; Luo et al., 2004). Pourtant, le mutant d'XRCC1 non phosphorylable par CK2 présente une cinétique de réparation des CSBs de l'ADN plus lente (Loizou et al., 2004). Il serait donc très intéressant de déterminer si la phosphorylation de l'interdomaine 1 est importante dans le maintien de la stabilité du génome.

A l'inverse, si le modèle suggère que les phosphorylations de l'interdomaine 1 sont importantes pour maintenir XRCC1 à l'écart des fonctions de PARP1 et PARP2 en absence de dommages à l'ADN, il est alors possible qu'un défaut des phosphorylations de XRCC1 affecte l'homéostasie cellulaire normale. Analyser l'effet de l'expression d'une protéine XRCC1 non phosphorylable dans son interdomaine 1 sur le niveau d'expression de gènes sous le contrôle de l'activité de PARP1 et PARP2 serait intéressant pour répondre à cette question.

Finalement, alors que l'absence de phosphorylation de l'interdomaine 1 stimule le recrutement de XRCC1, nous n'avons pas déterminé l'effet du maintien de ces phosphorylations, n'ayant pas été en mesure d'identifier la phosphatase requise dans cette étape. Pour répondre à cette interrogation, une alternative serait d'analyser le recrutement du mutant phosphomimétique XRCC1^{9D}. Sachant que la structure de l'interdomaine 1 est naturellement désordonnée, il est peu probable que la présence additionnelle d'acides aspartiques altère significativement cet aspect de la protéine XRCC1. En revanche, la présence de ces acides aminés phosphomimétiques pourrait affecter durablement la capacité de reconnaissance des PAR du domaine BRCT1 de XRCC1 et ainsi diminuer l'efficacité du recrutement de XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN. La survie du mutant XRCC1^{9D} en réponse aux dommages de l'ADN pourrait ainsi être fortement altérée.

CONCLUSION

L'objectif principal au cours de la division cellulaire, chez la majorité des cellules somatiques, est de dupliquer fidèlement son génome pour assurer la formation de deux cellules filles. Un défaut dans ce processus conduira à des altérations variées du génome. L'instabilité génétique peut donc être définie comme une propension à accumuler des modifications ou des altérations génétiques, pouvant conduire à l'arrêt du cycle cellulaire, à la mort cellulaire ou encore à la transformation néoplasique. Ainsi, l'apparition d'une instabilité génétique est très souvent à l'origine de la transformation cancéreuse ainsi que de l'hétérogénéité tumorale. Fort heureusement, des mécanismes existent pour assurer la fidélité de la réplication, pour permettre la migration précise des chromosomes lors de la mitose, pour coordonner la progression dans le cycle cellulaire ou encore pour réparer directement les lésions de l'ADN.

Alors que l'apparition d'une instabilité génétique favorise la transformation ainsi que la prolifération tumorale, son excès limite la prolifération clonale même au sein des tumeurs. En effet, il existe un seuil du nombre ou du taux d'apparition de mutations somatiques ponctuelles ou des variations de copies supportables au-delà duquel la capacité de prolifération tumorale est réduite (Andor et al., 2016; Birkbak et al., 2011). Par exemple, l'instabilité des microsatellites que l'on retrouve fréquemment dans les cancers colorectaux est synonyme d'un pronostic favorable (Vilar and Gruber, 2010). Le niveau d'instabilité génétique ainsi que d'hétérogénéité intra-tumorale pourraient donc être des facteurs prédictifs de l'efficacité des traitements anticancéreux.

La compréhension des mécanismes qui régulent la stabilité du génome est donc essentielle à tous les niveaux : dans la prévention de la transformation néoplasique, dans l'identification des mécanismes génétiques ou épigénétiques à l'origine des tumeurs, dans l'amélioration de l'efficacité des traitements conventionnels, dans la stratification des patients répondeurs et dans la compréhension des mécanismes de résistances anti-tumoraux et enfin dans le développement de nouvelles stratégies anti-tumorales permettant d'améliorer l'efficacité des stratégies conventionnelles ou d'en limiter les effets secondaires.

Les études menées au cours de mon doctorat, ont permis d'améliorer nos connaissances fondamentales des mécanismes qui régulent les voies de la réparation de l'ADN. Dans ce contexte, j'ai particulièrement étudié les fonctions des protéines PARP2 et XRCC1, deux protéines essentielles au cours de la réparation de l'ADN. J'ai pu ainsi mettre en évidence une nouvelle fonction de la protéine PARP2 dans la régulation du choix des voies de la réparation des CDBs de

l'ADN, ainsi qu'un mécanisme de modifications post-traductionnelles par phosphorylation, régulant le recrutement de XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN. Ces deux axes de recherches, bien que différents, mettent tous deux en évidence des nouveaux points de contrôle de la réparation de l'ADN et il sera donc important par la suite d'intégrer ces fonctions dans un contexte plus général pour comprendre comment ils participent au maintien de l'intégrité cellulaire. Dans un contexte où l'utilisation des inhibiteurs de PARP s'étend en clinique, nous mettons aussi en évidence l'importance d'étudier les fonctions de la protéine PARP2, bien trop souvent délaissées. En effet, même si le mécanisme que nous avons identifié est indépendant de l'activité enzymatique de PARP2, il est possible que la modification de l'expression de cette protéine ait un impact direct sur les réponses cellulaires aux traitements anti-tumoraux.

ANNEXE
Résumé des séquences aux points de jonction des extrémités

siControl : 147 clones

Events limited to the 3'Pnt : 50.3% (74/147)

High Fidelity : 21.1% 31 clones

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X31	

Deletions limited to the 3'Pnt : 17.7% 26 clones

		Size of the deletion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG-**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X8	-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTA**-CCCTATCTAGATATGAAA	X4	-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG--**AT**CCCTATCTAGATATGAAA	X4	-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**--CCCTATCTAGATATGAAA	X7	-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**---CCCTATCTAGATATGAAA		-3
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG---**T**CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-3

Insertions without deletion: 9.5% 14 clones

		Size of the insertion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGT**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X3	+1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**GGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAAT_CCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	+49
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**CCTCGAGKGGCTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCC**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	+74
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CAGAACTGCCCTTCGAAGCACGAGTGACACCTAAGAAGTGGTCTCAGAATGTTGGTTGGGACCAGTAGCTGTGACATCAGTTAAGGAATCAGTCTTCCCCTATCTAGATATGAAA	Homo sapiens chromosome 17, clone RP5-906A24, complete sequence	+97
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTA**CATCTTAAGGATATTGATAATCTTTTGTTATATTTGATGCAAATATTTTTTTCCAGTTTATAGGTTGCCTTTTAATTTTGTGTTTCAGGTAGATAAAAGTTAAACGATTTTCTTAGGTTAGTTTA**T**CCCTATCTAGATATGAAA	Homo sapiens MEN1 region genomic sequence	+125
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**GGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATTATCCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	+133
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**GATTTCGAATTTAATACGACTCACTATAGGGAATTAACTTTCTGGTTTTTCAGTTCCTCGAGGAGCTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGTCCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	+134
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTA**CATGCCCCCACAAGAGGCCCCAGCACATGGCCCCAGGGGTGTCCGGCCCCTCTTCCCTTCGAGGAGGAGCTGCCCTCACACTCCCCTCGACAGAAGGTCACAGGCGTGAAATGGGTCCCTCCCAGTGACCTGGCCAGGCCTTGGGTGTGAGTTGGAA**T**CCCTATCTAGATATGAAA	Homo sapiens chromosome 5 clone CTB-31E20, complete sequence	+157
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGGAA**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	+158
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**GCTGAATTCCAGCCAATCCTCGCCAGCTTCAGGGACAGGCTCTTCCACCACATGTCATTTAATAGATGGAGGACTGGAGCTCTGGGGAGCTTAAAAGTTTTTGTCCCTTCAAAGTTGGAGTCACCACACTCCATCCAAGGCTGGGTCCCATACTCAGGAGTCTAATAACCCTGAATATGTGTT**AT**CCCTATCTAGATATGAAA	**Not found**	+183

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**TACCCATTCTTGGATTCTAGCCTGTTCCAGTGGACCACTTGTTCATGCGCCGACACATATTATTTTGATGAAAATCACTTTATCTTAAATGTCAATATTTGGTAAGGCAAATGTACCCTATTTTCTTTTTCAGAATTATCTGCCAAAGTCTACAAGGCTATATGACAATATCCCACCACAATTATGCTTTTTAATCCCTATCTAGATATGAAA	Homo sapiens FOSMID clone ABC11-47189800F14 from chromosome 2, complete sequence	+195
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGTTATGATCCCTTTTTAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTA**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	+375

Insertions with deletion in the 3'Pnt : 2.0% 3 clones		**Size of the deletion/insertion**
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGGCATGCCACCCAGGTTCATGTGATTTTCCTGCCTCAGCCTCTGAGTAGGTGGGACTGCAGGCACGCCATGCCCGGTTAATTATTTGTATTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACTCCTGACCTCAGGTTACCTGCTTGCCTTGCTAGGACTTATGTCTTAGAGCCATGTTTTCCGAAGTGGCCTACTGATTGAGGGTGRGAAGCACTTGCAAAATATACAGGTTTATAAGCTCCAGCCTAGACCTACAGAATCACAATCTCAGGGAAAGAATCAGAAATTGTATGTCTACCAAGCATGCAAGTTCATTTTT-**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-432G16, complete sequence	-1 / +333
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**ATGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAAT--CCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	-2 / +51
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGAACTGCATACAGTAGGTTTTACCTTCATCACGAGAACGGATGTAAGCATCACCCAGGATCAGACCGATACCTGCTTCGAACTGTTCGATGTTCAGTTCGATCAGCTGGGATT---**T**CCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	-3 / +112

Deletions exceeding the 3'Pnt : 49.7% (73/147)

Deletions : 39.5% 58 clones		**Size of the deletion**
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT-**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X3	-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT--**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X3	-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---**AT**CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-3
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTAC----**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-4
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT-----CCCTATCTAGATATGAAA		-5
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA-----**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-5
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**C------TAGATATGAAA		-6
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC-------CCTATCTAGATATGAAA		-7
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC--------CTATCTAGATATGAAA		-8
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA---------CCCTATCTAGATATGAAA	X4	-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---------ATCTAGATATGAAA	X8	-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAAT----------**T**CCCTATCTAGATATGAAA		-10
CTAGAGCAACACGGAAGGAATT----------CCTATCTAGATATGAAA		-11
CTAGAGCAACA----------TATCTAGATATGAAA		-24
CTAGAGCAACACGGAAGGA----------TATGAAA		-24
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT----------CACGCCATGT		-24
CTAGAGCAACACGGA----------AGATATGAAA		-25
CTAGAGC----------CCCTATCTAGATATGAAA		-25
CTAGAGCAACACG----------GATATGAAA		-28
CTAGAGCAACACGGAAGGAATT----------ACGCCATGTA		-30
TGGCTAGCGC----------TCTAGATATGAAA		-38
CTAG----------TATGAAA	X2	-38
CTAGAGCAA----------CACGCCATGT		-42
CCCAAGCTGG----------CTAGATATGAAA		-46

CTAGAG----------CGCCATGTAG		-47
CTAG----------//----------TAGTGTATTG		-56
CTAGAGCAACACGGAA----------//----------TGGGCCGAAC		-75
CTGGCTAGCG----------//----------ATTCCTTGCG		-76
CTAGAGCAAC----------//----------CCGGTCACCC		-91
CTAGAGCAACACGGAAGGAATT----------//----------CGAGCTCGCC		-98
CTAGAGC----------//----------CCTAGTCAAT		-128
CTATAGGG----------//----------GAGCTCGCCC		-142
TTATCGAA----------//----------TTCGAGCTCG		-161
CTAGAGCAACACGGAAGGAA----------//----------GGACTGGCCA		-174
CTAGAGCAACACGGAAGGA----------//----------TTCCCAACCAF		-194
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**----------//----------GCCGAGCCA		-220
CTAGAGCAACACG----------//----------GAGCCATCTC		-239
CATCTCGCGG----------//----------GTGAGTCGTA		-293
CTAGAGCAAC----------//----------TCCTAGCTGT		-293
CTGGCTTATC----------//----------TCTCTTAGGC		-306
CTAGAGCAACAC----------//----------GGAAGGGGAA		-331
Deletions with Insertions : **10.2%** **15 clones**		**Size of the deletion/insertion**
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**GGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTG CAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGT GTTATCACTCRTGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGA TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC CGAGTTG-CCTATCTAGATATGAAA		-1 / +217
CTAGAGCAACACGGAAGG- CTTAGCTTCTCCACTCCCCAGGATAATCGACTCACCCAGCAGCAGCAGGTTCAGCGACAG AAAGCGGGTCAACGGTGAGGCCATGGTGTGCTCTCCCCTAGAGCCCTACGGAATTCGAGC TCGCCCGGGGATCTCGAGGTCACCCTGACGGTGTCGTCCATCACAGTTTGCCAGTGATAC ACATGGGGATCAGCAATCGCGCATAATCGATATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGA AA	**Intrachromosomal substrate**	-1 / +211
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT--- CAGAACTGTCTTCATCGTAGCTCTACTTTTCTTGGCCACATTGGATAAATTACTTAATCTC TTTGAGCTTTACATTATGGAGATATTTCAAAGTATACCTAATAACCTCGATTCCTAATAGA TAGCTATTACGATGACTGGTTTTCAACCGTTGTTCAGG**AT**CCCTATCTAGATATGAAA	**Not found**	-3 / +160
CTAGAGCAACACGGAAGGAA-------CA-------CTATCTAGATATGAAA		-14 / +2
CTAGAGCAACACGGTGTGAGTGGGGGCCAGGGCGGCCGCCAACAGCAGGAGCAGCGTGC AGGGTGCCATCGCACTGGTCGGCGATTAGCGACTTCTGAGTTCCGACGGATCCGAGCTCG GTACCAAGCTTAAGTTTAAACGCTAGCTAGGGATA---------- **AT**CCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	-16 / +140
CTAGAGCAACACGG----------CCATTTA------CCCTATCTAGATATGAAA		-18 / +7
GGCTAGCGCTAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAC AAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTCGCCATTCAGG CTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCC----------//---------- **TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	-28 / +148
CTAGAGCAACACGGAAT----------TCACGCCATG		-34 / +1
GAAATTAATA----------//----------AGAC**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-65 / +4
CTAGAGCAACACGGC----------//----------CTCTAGAGTC		-124 / +1
GCTTATCGAAT----------//----------GGTCACCCAT		-146 / +1

CAACGGGACT----------//----------ACATGGCCATGTAGT		-222 / +5
ACGGTGGGAG----------//----------CCGTGTACGAGCTCGCC		-223 / +7
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGTGATTTCATATCTAGA----------//----------TCTCGAACGA		-227 / +16
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA----------//----------GAGCAGCAGCAGCAGCAAGCGCCTAAGAGAGATGGCTCGGCACATGGTGGTCTCCTTGAGCTCTTGTTGGTTGGGAATCTGAGCCTCTGGCCAGTCCTTCCTTCACTCTGCTTCTTGCACAGGTGTGTGTATATGAGGGCTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGCGAGCTCGAATTCGAATGGGTGACCGGGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTCATCTGCAGCTGT	Intrachromosomal substrate	-264 / +246

siPARP2 : 100 clones

Use of the 3'-Pnt : 64.0% (64/100)

High Fidelity : 36.0% 36 clones

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X36	

Deletions of the 3'Pnt : 23.0% 23 clones

		Size of the deletion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG-**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X4	-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTA**-CCCTATCTAGATATGAAA	X3	-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**--CCCTATCTAGATATGAAA	X8	-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG--**AT**CCCTATCTAGATATGAAA	X3	-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**---CCCTATCTAGATATGAAA	X4	-3
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG----CCCTATCTAGATATGAAA		-4

Insertions without deletion : 5.0% 5 clones

		Size of the insertion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CACGCGGCCCCACATTCCCGGATTCCCGTAGCTCCTTTGGGCTCGCGGCAACTTTGATGTCTAACTCTGTCACTTATGGAGCGGGACGGGTGACGTCCCTATCTAGATATGAAA	Homo sapiens chromosome 17, clone RP11-1055B8, complete sequence	+96
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**CAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	Intrachromosomal substrate	+108
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**GCAGGGAGGAGTCCTGGGTCACGGTCGCCACGCCGCCGTCCTCGAAGTTCATCACGCGCTCCCACTTGAAGCCCTCGGGGAAGGACAGCTTCTTGTAGTCGGGGATGTCGGCGGGGTGCTTCACGTACACCTTGGAGCCGTACTGGAACT**AT**CCCTATCTAGATATGAAA	Intrachromosomal substrate	+150
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**TCCCAATCCAGTCCCCGCAAGCCAGATGCCTGGCGGGGCGGCCCCCAAACGTTTCTCGCTCCCCGCACATGGTCCCTCTTCCTACACCCTTTGGGCAGGGGAGAAGGACCCTCAGACAAATGTGCTGATGGAGGCAGCAGGCGTTTGCTGGGTTATCCCTATCTAGATATGAAA	Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-410M9, complete sequence	+156
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**AATCTCTGAATTCTACACAATAAAAGAATGAATTTTGTGTTATGTGAATTATATCACAACAAAGTTGTTTTTAAAATAGCAGGGACATGTCGGCTATTTGTTTTATATTCCCTACTTTGCCTTCTTTCAAGGATTTCAACGCATTGGTAGTAGATAAATGATTGCTGGACAAATAAATAAATGGACAGCAAGTACTTTCCTGATTAAAAATTATTTCAATACCTTATTTCTTGATCTGTCAGGCCAATGTTCTTGTCATTAGCCATCATCTTTCTCTTCAAAATATATCACTCCACAGGTGTGCTGGATGTCTTTATTTTGCCTCTAGGTCTAATTCCCACCCTTCTCCACCCTACTCTGTGCCCCCATAGGCCAACATCTATGGACTTTATCTGCTAGGCTGAAGGGTTGTTGTCTGGCTTCTGGGGAGGTTCAGCCAATGGAAGCACTGGCAGATTAGAGGGCAGGAGGAAGGAGGGGTTGGGGTTCTTATTCCTTTAGCTGGCTCCTTGCCAGACCATACATCTTGATATCCCTATCTAGATATGAAA	Homo sapiens ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase (ROS1), RefSeqGene on chromosome 6	+533

Deletions > 3'-Pnt : 36.0% (36/100)

Deletions : 26.0% 26 clones		Size of the deletion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---**AT**CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-3
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACC---**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-3
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTAC----**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-4
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT-----CCCTATCTAGATATGAAA		-5
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT-----CCCTATCTAGATATGAAA		-5
CTAGAGCAACACGGAAGGAATT-------**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-7
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA--------**T**CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-8
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**---------CTAGATATGAAA		-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---------ATCTAGATATGAAA	X4	-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAAT----------CCCTATCTAGATATGAAA		-11
CTAGAGCAACACGGAAGGAAT----------CTAGATATGAAA		-17
CTAGAGCAACAC----------TATCTAGATATGAAA	X2	-23
CTAGAGCAACA----------TATCTAGATATGAAA		-24
CTAGA----------TATGAAA		-38
CTAGAGCAA----------TCACGCCATG		-41
CACTATAGGG----------//----------CCTATCTAGATATGAAA		-54
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT----------//----------CATATACACA		-128
CGGTAGGCGT----------//----------**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-144
CTAGAGCAACACG----------//----------GAAGGAAGGA		-173
CTAGAGCAACACGGAAGG----------//----------CCAGAGGCTC		-182

Deletions/Insertions : 10.0% 10 clones		Size of the deletion/insertion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**----- GCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTG GATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTT TATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGG GCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCACTATCTAGA TATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	-5 / +231
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG----------AAAAGATATGAAA		-12 / +3
CTAGAGCAACACGGAAG--------CG---------CTATCTAGATATGAAA		-17 / +2
CTAGAGCAACACAGTGTGCTACGGTGTTTTAAGAGGTCATCACGCCTGCATCAGAATTGA TTCTTTTTCCACCCGGCATATATGAGGGGACCATGAGAACACTGTGGGTCGGCAGAGTTC CAAACTTTTAACTCTGCCAGCTCCTGAACTTAGCTATAATCT---------- **TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	Homo sapiens neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like, E3 ubiquitin protein ligase (NEDD4L), RefSeqGene on chromosome 18	-16 / +150
CTAGAGCAACACGGA----------GTCTCCCTA----------TAGATATGAAA		-24 / +9
CTAGAGCGCTATTATATCTAGAGCGCTAGATATTCA---------- TATCTAGATATGAAA		-28 / +29
ACTCACTATA----------//----------TACCCTATCTAGATATGAAA		-56 +2
AGACCCAAGCAGCTTGG----------//----------GTATTGACCG		-75 / +7
ATAAGCAGAG----------//----------ATATGAAATCTATCTAGATATGAAA		-121 / +9
GACCCAAGCTT----------//----------GCTTGCTG		-280 / +1

siPARP1 : 70 clones

Use of the 3'-Pnt : 50.0% (35/70)

High Fidelity : 34.3% 24 clones

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X24	

Deletions of the 3'Pnt : 14.3% 10 clones

		Size of the deletion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG-**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X7	-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**--CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**---CCCTATCTAGATATGAAA		-3

Insertions without deletion : 1.4% 1 clone

		Size of the insertion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**TTCACTTTCGAAGAAGTAGAATACCTGG TTAAGGGTCTGCGTAACAAATTCCAACTGAACTGTTACGTAAAAATCAACAAAAACA AACCGATCATCTACATCGATTCTATGTCTTACCTGATCTTCTACAACCTGATCAAACC GTACCTGATCCCGCAGATGATGTACAAACTGCCGAACACT**AT**CCCTATCTAGATATGA AA	Intrachromosomal substrate	+183

Deletions > 3'-Pnt : 50.0% (35/70)

Deletions : 42.9% 30 clones

		Size of the deletion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**------CTAGATATGAAA		-6
CTAGAGCAACACGGAAGGAA--------**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-8
CTAGAGCAACACGGAAGGAA--------**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-8
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA---------CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---------ATCTAGATATGAAA	X9	-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**---------CTAGATATGAAA		-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAATT----------CCCTATCTAGATATGAAA		-10
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**----------AGATATGAAA	X2	-11
CTAGAGCAACACGGAAGGAA----------TATCTAGATATGAAA		-15
CTAGAGCAACACGGAAGGA----------TATCTAGATATGAAA		-16
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG----------GAAA		-18
CTAGAGCAACACGGAAGGA----------TATGAAA	X2	-24
CTAGAGCAACACGGAAGGAAT----------CACGCCATGT		-30
CTAGAGCAACACG----------CCATGTAGTG		-42
CTAGAGC----------//----------AGTGTATTGA		-54
AGACCCAAGC----------//----------CATGTAGTGT		-67
CCAAGCTGGC----------//----------TAGTGTATTG		-67
CTAGAGC----------//----------GAATTCGAGC		-108
CCACTGCTTA----------//----------CTGTGCAAGA		-224

Deletions/Insertions : 7.1% 5 clones

		Size of the deletion/insertion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**TGCCCAGACTGCTCTCCAACTCCTGGCCTC ATGTGATCCGCCCGCCTCAGCCTCCCAAACTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACCATGC CCAGCCAGATCTTAGGATACTTTCTGAGTGATATAGTTGAGTAAGAACCATGGCTAGATC ACTTAGCTGAAATTAAAGAAATTACTCCACTGGATCAACC------ATCTAGATATGAAA	Homo sapiens PAC clone RP1-146I3 from 14q24.3, complete sequence	-6 / +190
CTAGAGCAACACGGAAGGAATT------TCA-------TATCTAGATATGAAA		-13 / +3
CTAGAATATCGATTATGCGCGATTGCTGA---------- ATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-14 / +24

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTGATAGATTTCATATCACTGGCAAACTGTT----------
TATCTAGATATGAAA -14 / +30

AGACCCAAGCACGCTGCTCCTGCTGTTGGCGGCCGCCCTGGCCCCCACTCAGACCCGCGC
GGGCCCACATTCGCTGAGGTATTTCGTCACCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCTCGGGGAGCC
CCGGTTCATCGCTGTCGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGC
GGATAATCCGAGATTTGAGCCGCGGGCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATT
GGGAGGAGCAGACACAGAGAGCCAAGAGCGATGA----------//----------
CCCTATCTAGATATGAAA **Intrachromosomal substrate** -43 / +263

siCtIP : 88 clones

Use of the 3'-Pnt : 70.4% (62/88)

High Fidelity : 43.2% 38 clones

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA X38

Deletions of the 3'Pnt : 15.9% 14 clones **Size of the deletion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG-**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA X3 -1

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**--CCCTATCTAGATATGAAA X7 -2

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**---CCCTATCTAGATATGAAA X2 -3

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG----CCCTATCTAGATATGAAA X2 -4

Insertions without deletion : 9.1% 8 clones **Size of the insertion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGT**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA +1

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**GCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGG
GGACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCCACAGCCATTATCCCTATCTAGATATGAAA **Intrachromosomal substrate** +71

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCTCTCCCCTAGAGCCCTACGGAATTCGAGCTCGCCC
GGGGATCTCGAGGTCACCCTGACGGTGTCGTCCATCACAGTTTGCCAGTGATACACATGG
GGATCAGCAATCGCGCATAATCGATATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA **Intrachromosomal substrate** +126

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAG
GAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGA
AAGTTAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTG
TGGAA**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA **Intrachromosomal substrate** +158

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTG
AGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCA
GAAAGTTAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTG
TGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACTATCCCTATCTAGATATGAAA **Intrachromosomal substrate** +182

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**AGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGG
GGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGA
TTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTT
TTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGC **Intrachromosomal substrate** +209
CCTATCTAGATATGAAA

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**TCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGC
TTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGC
ACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGAT
AGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCA
AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTTTATCCCTATCTAGATATGAA **Intrachromosomal substrate** +255
A

CTAGAGCAACACGGAAGGAATCGATTATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGG
CAAACTGTGATGGACGACACCGTCAGGGTGACCTCGAGATCCCCGGGCGAGCTCGAATTC
CGTAGGGCTCTAGGGGAGAGCACACCATGGCCTCACCGTTGACCCGCTTTCTGTCGCTGA
ACCTGCTGCTGCTGGGTGAGTCGATTATCCTGGGGAGTGGAGAAGCTAAGCCACAGGCAC
CCGAACTCCGAATCTTTCCAAAGAAAATGGACGCCGAACTTGGTCAGAAGGTGGACCTGG
TATGTGAAGTGTTGGGGTCCGTTTCGCAAGGATGCTCTTGGCTCTTCCAGGGTAATATTAC **Intrachromosomal substrate** +337
CCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA

Insertions with deletion of the 3'Pnt : 2.3% 2 clones

		Size of the deletion/insertion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGGAATTGTG--**AT**CCCTATCTAGATATGAAA	Intrachromosomal substrate	-2 / +164
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**CGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGAC-**T**CCCTATCTAGATATGAAA	Intrachromosomal substrate	-1 / +271

Deletions > 3'-Pnt : 29.5% (26/88)

Deletions : 22.7% 20 clones

		Size of the deletion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT-----CCCTATCTAGATATGAAA		-5
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC------CCCTATCTAGATATGAAA		-6
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**------CTAGATATGAAA		-6
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**C------TAGATATGAAA	X3	-6
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA------**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-6
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA--------**T**CCCTATCTAGATATGAAA		-8
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC--------CTATCTAGATATGAAA	X2	-8
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---------ATCTAGATATGAAA	X5	-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTA**----------GATATGAAA		-10
CTAGAGCAACACGGAAGGAAT----------CCCTATCTAGATATGAAA		-11
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT----------AGATATGAAA		-13
CTAGAGCAACACGGAAGGA----------TATGAAA		-24
CTA----------**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-26

Deletions/Insertions : 6.8% 6 clones

		Size of the deletion/insertion
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCA-**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	Intrachromosomal substrate	-1 / +136
CTAGAGCAACACGGAAGCAACAGCGACAGAAAGCGGGTCAACGGTGAGGCCATGGTGTGCTCTCCCCTAGAGCCCTACGGAATTCGAGCTCGCCCGGGGATCTCGAGGTCACCCTGACGGTGTCGTCCATCACAGTTTGCCAGTGATACACATGGGGATCAGCAATCGCGCATAATCGAT--ATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	Intrachromosomal substrate	-2 / +163
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC----------CC----------TCACGCCATG		-24 / +2
GACCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGAACTCAGAAGTCGCTAATCGCCGACCAGTGCGATGGCACCCTGCACGCTGCTCCTGCTGTTGGCGGCCGCCCTGGCCCCCACTCAGACCCGCGCGGGCCCACAGTTTGCCAGTGATACACATGGGGATCAGCAATCGCGCATAATCGAT----------ATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	Intrachromosomal substrate	-29 / +164
CTGGCTAGCGTTTCATATCTAGATAGCTAGATAGGG----------CTATCTAGATATGAAA		-36 / +26
AGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAATTCAGATCCGCCGCCACTATGGCCTCCTCCGAGAACG---------//----------**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	Not found	-113 / +56

siCtIP + siPARP2 : 26 clones

Use of the 3'-Pnt : 69.2% (18/26)

High Fidelity : **38.5%** **10 clones**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA X10

Deletions of the 3'Pnt : **15.4%** **4 clones** **Size of the deletion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**---CCCTATCTAGATATGAAA X3 -3

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG----CCCTATCTAGATATGAAA -4

Insertions without deletion : **15.4%** **4 clones** **Size of the insertion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTAT
GTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACATGATTAC
GAATTTAATACGACTCACTATAGGGAATTAACTTTCTGGTTTTTCAGTTCCTCGAGGAGCT
TTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGG
CCGAGGCGGCCGCTTATCCCTATCTAGATATGAAA **Intrachromosomal substrate** +227

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTA**CAATGTAATCTAAGAGCAGACTGGCAGAA
TGTCGACCAGCCATCTTTGGTACATATTTGTTGAGGTTTTCTCTGTGCCAAGCCTATGCCT
GGTAGTGTAGAGCATTCAAGAAAAGCCCGAGATATTTATTACTGCCCTCAAAGAGAAAGT
CTTCCATATTCCCAGATCTGAGAAATTTCACTCTCAAGTTTCCCCTGTCATGAGCAGCACT
CTGGTGTCCTTACAGTCACTTGCAAGCATGCCTGTTCTCAGCAGACCTTAAGCCTCTGTGC
ATA**T**CCCTATCTAGATATGAAA Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2052F19, complete sequence +275

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**TATACGAAGATATTTCCTTTTCTACCGTTGA
CCTCAAAGCGGCTGAATTCTCCACTTACAAATTCCACCAAAAGAGTGTCTCAAATCTGCTC
TGTGTAAAGAATCGTTCAACTCTGTGAGTTGAATGCACACAACACAAGGAAGTTACTGGG
AATTCCTCTGTCTATCCTTACATGAAAAAACCCGTTTCCAACGAAGGCCTCTAAGAGGCCA
AGATATCCACTTGCAGACTTTACAAACAGAGTGTTTCCAAACTGCTGAATGAAAAGAAAA
GTTAAACTCTGTG**AT**CCCTATCTAGATATGAAA H.sapiens CpG island DNA genomic Mse1 fragment, clone 170f9, reverse read cpg170f9.rt1a +286

CTAGAGCAACACGGAAGGACCCCAACACTTCACATACCAGGTCCACCTTCTGACCAAGTT
CGGCGTCCATTTTCTTTGGAAAGATTCGGAGTTCGGGTGCCTGTGGCTTAGCTTCTCCACT
CCCCAGGATAATCGACTCACCCAGCAGCAGCAGGTTCAGCGACAGAAAGCGGGTCAACG
GTGAGGCCATGGTGTGCTCTCCCCTAGAGCCCTACGGAATTCGAGCTCGCCCGGGGATCT
CGAGGTCACCCTGACGGTGTCGTCCATCACAGTTTGCCAGTGATACACATGGGGATCAGC
AATCGCGCATAATCGATATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA **Intrachromosomal substrate** +298

Deletions > 3'-Pnt : 30.7% (8/26)

Deletions : **30.7%** **8 clones** **Size of the deletion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**C------TAGATATGAAA -6

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA--------**T**CCCTATCTAGATATGAAA -8

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---------ATCTAGATATGAAA -9

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT----------ACGCCATGTA -25

CT----------CTATCTAGATATGAAA X2 -32

CTAGAGCAACACG----------CCATGTAGTG -42

CTAG----------CCATGTAGTG -51

siBRCA1 : 50 clones

Use of the 3'-Pnt : 76.0% (38/50)

High Fidelity : **54.0%** **27 clones**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA X27

Deletions of the 3'Pnt : **18.0%** **9 clones** **Size of the deletion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**--CCCTATCTAGATATGAAA X3 -2

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**---CCCTATCTAGATATGAAA X3 -3

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG----CCCTATCTAGATATGAAA X3 -4

Insertions without deletion : 2.0% 1 clone — Size of the insertion

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTG
AGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCA
GAAAGTTAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTG
TGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
AAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCG
CTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA
GAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT
CGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAATCCCTATCTAGATATGAAA — Intrachromosomal substrate — +427

Insertions with deletion of the 3'Pnt : 2.0% 1 clone — Size of the deletion/insertion

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**--
GCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTT
GCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAATTCCCTATAGTGAGTCGTAT
TAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGGAT**T**CCCTATCTAGATATGAAA — Intrachromosomal substrate — -2 / +160

Deletions > 3'-Pnt : 24.0% (12/50)

Deletions : 20.0% 10 clones — Size of the deletion

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**------CTAGATATGAAA	X2	-6
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC--------CTATCTAGATATGAAA		-8
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---------ATCTAGATATGAAA		-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**----------GAAA		-14
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA----------GATATGAAA		-18
CTAGAGC----------CATGTAGTGT		-49
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTAC----------//----------ATATACACAC		-132
ATTGACGCAA----------//----------TCACGCCATG		-180
GCTCACTCAA----------//----------**AT**CCCTATCTAGATATGAAA		deletion > 320pb

Deletions/Insertions : 4.0% 2 clones — Size of the deletion/insertion

GGCTAGCGCT----------AGC----------TATGAAA	-43 / +3
TGACGCAAAT----------//----ATCA----------TATCTAGATATGAAA	-163 / +4

siBRCA1 + siPARP2 : 46 clones

Use of the 3'-Pnt : 65.2% (30/46)

High Fidelity : 47.8% 22 clones

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA — X22

Deletions of the 3'Pnt : 13.0% 6 clones — Size of the deletion

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG-**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X3	-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG--**AT**CCCTATCTAGATATGAAA		-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**--CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-2

Insertions without deletion : 4.3% 2 clones — Size of the insertion

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CGGCCTCTGAGnTATTCCAGAAGTAGTG
AGGAGGCTTTTTnGGAGGCnTAGGCTTTnnCnnAnAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGA
AAGTTAATTCCCTATAnTGAGTCGTATTAAATTnGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGT
GAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAG
CCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT
CCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGG
CGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTT
TATCCCTATCTAGATATGAAA — Intrachromosomal substrate — +397

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGTTTCGAGCTGTAAAGTTCTTTCTTCTAATTGTT nTATTCTATTGTTGAAACTTTTCAGTGTATTCTTCATTTCATCGAATGTGTCTTTCATTTCC AGAAGTTGTGATTTGTTTTTTATTTATGCTGTCTATTTCTCTGGAGATTTTCCTTCCATATC TGATTTGGTGATCTGAAGGAAGACCTTCTGCTATAATTGACACATAACCAGATGGAAAAT AGTATCTATGTGA**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA — Human DNA sequence from clone RP11-353K22 on chromosome X, complete sequence — +230

Deletions > 3'-Pnt : 34.8% (16/46)

Deletions : 30.4% 14 clones — Size of the deletion

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT-**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**----ATCTAGATATGAAA		-4
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT------CCTATCTAGATATGAAA		-6
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---------ATCTAGATATGAAA	X2	-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**----------ATGAAA		-12
CTAGAGCAACACGGAAGGAA----------CCTATCTAGATATGAAA		-13
CTAGAGCAACACGGAAGGA----------TATCTAGATATGAAA	X2	-16
CTAGAGCAACACG----------**T**CCCTATCTAGATATGAAA		-18
CTAGAGC----------CCTATCTAGATATGAAA		-26
CTAGAGCAA----------TATGAAA		-34
CTAGA----------TATGAAA		-38
ACTATAGGGA----------//----------AA		-68

Deletions/Insertions : 4.3% 2 clones — Size of the deletion/insertion

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCACAATTCCACACAGGAAACAGCTATGACATGATT ACGAATTTAATACGACTCACTATAGGGAATTAACTTTCTGGTTTTTCAGTTCCTCGAGGAG CTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAG GC---**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	Intrachromosomal substrate	-3 / +158
CTAGAGCGCTCTTAGGCGCTTGCTGCTGC----------//---------AGCTGTCACA		-284 / +22

si53BP1 : 44 clones

Use of the 3'-Pnt : 36.4% (16/44)

High Fidelity : 20.4% 9 clones

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X9	

Deletions of the 3'Pnt : 13.6% 6 clones — Size of the deletion

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG-**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG--**AT**CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**--CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-2

Insertions without deletion : 2.3% 1 clone — Size of the insertion

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGCTCGGCGTAGGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAG GAGGCTTTTGCGSAGGCGTAGGCTTTTGCACAAAGCTCCTAGAGGAACAGAAAAACCAAA AAGTTAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCACAGCTGTTTCCTGTG TGAA**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	Intrachromosomal substrate	+157

Deletions > 3'-Pnt : 63.6% (28/44)

Deletions : 56.8% 25 clones — Size of the deletion

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**-CCTATCTAGATATGAAA		-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT-**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X3	-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**----CCTATCTAGATATGAAA		-4
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT-------CTATCTAGATATGAAA		-7

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**-------ATCTAGATATGAAA		-7
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC-------CCTATCTAGATATGAAA		-7
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---------ATCTAGATATGAAA	X5	-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA----------CCTATCTAGATATGAAA	X2	-10
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACC----------TATCTAGATATGAAA		-10
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**----------GAAA	X2	-14
CTAGAGCAACACGGAAGGA----------CCTATCTAGATATGAAA	X2	-14
CTAGAGCAACACGGAA----------CTAGATATGAAA		-22
CTAGAGCAACACGGAAGGA----------TATGAAA		-24
CTAGAGCAACACGGAAG----------GATATGAAA		-24
CTAGAGCAACACGGAAGGAAT----------CACGCCATGT		-30
CTAGAGCAACACGGAAGG----------AA		-30

Deletions/Insertions : **6.8%** **3 clones** **Size of the deletion/insertion**

CTAGAGCAACACGGAAGTTTGCCAGTGATACACATGGGGATCAGCAATCGCGCATAATCG AT--ATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA		-2 / +45
CTAGAGCAACACGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTA---------//-------ACGCCATGTA		-38 / +22
ATATAAGCAGGGTAATTCCTTCCGTGTTGCTCTAGAGCGCTAGCCAGCTTGGGTCTCCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTCGATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTTCTCTAGTTAGCCAGAGA GCTCTGCTTATATAGAGCATCCCCGGGCGAGCTCGAATTCGAATGGGTGACCGGGTTCGG CCCATTCGGACCGCAAT--------//-------**T**CCCTATCTAGATATGAAA	Intrachromosomal substrate	-120 / +188

si53BP1 + siPARP2 : 41 clones

Use of the 3'-Pnt : 51.2% (21/41)

High Fidelity : **14.6%** **6 clones**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X6	

Deletions of the 3'Pnt : **26.8%** **11 clones** **Size of the deletion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG-**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X4	-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**--CCCTATCTAGATATGAAA	X4	-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**---CCCTATCTAGATATGAAA		-3
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG----CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-4

Insertions without deletion : **4.9%** **2 clones** **Size of the insertion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGTCGCTTTTGCAGATAAACGAGCAGGGATCCTA CCTCTTTTGACCGGAGATGTTGAAAAGCACGACCAAAGTTTTTGGCTTGGTCTCTTGCTTT CCACAACGAGATAAAGTCTGAAGCCTGTAACTCTCCCTGTCCCGCGGGAGCGTGCAAAGG GAGGGAAGATAAGCGGCGTGGGTGAGGGGTGGCGGCGCAT**TTAT**CCCTATCTAGATATG AAA	Homo sapiens chromosome 3 clone RP11-385A18 map 3p, complete sequence	+193
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGGGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC GCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAG CTMTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCA AAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATT**TTAT**CCCTATCTAGATATGA AA	Intrachromosomal substrate	+194

Insertions with deletion of the 3'Pnt : **4.9%** **2 clones** **Size of the deletion/insertion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAG GAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGA AAGTTAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTG TGGAATTGTGA-**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	Intrachromosomal substrate	-1 / +164

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**CACAATTCCACACAGGAAACAGCTATGACAT
GATTACGAATTTAATACGACTCACTATAGGGAATTAACTTTCTGGTTTTTCAGTTCCTCGA
GGAGCTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTC
AGAGGCCGAGGC--**T**CCCTATCTAGATATGAAA — **Intrachromosomal substrate** — -2 / +165

Deletions > 3'-Pnt : 48.8% (20/41)

Deletions : 41.5% 17 clones — **Size of the deletion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**---------CTAGATATGAAA	X2	-9
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**----------GAAA	X2	-14
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG----------ATATGAAA	X2	-14
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA----------TCTAGATATGAAA		-14
CTAGAGCAACACGGAAGGA----------TCTAGATATGAAA		-18
CTAGAGCAACACGGAAG----------ATATGAAA	X2	-25
CT----------**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-27
CTAGAGCAACACG----------CCATGTAGTG		-42
CTAGAGCA----------CACGCCATGT		-42
CTAGAG----------CGCCATGTAG		-47
GCTGGCTAGC----------//----------CATGTAGTGT	X2	-59

Deletions/Insertions : 7.3% 3 clones — **Size of the deletion/insertion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT--TT--**T**CCCTATCTAGATATGAAA	-4 / +2
CTAGAG----------//----------GCGAATTCGAATTC	-105 / +4

GCTCTCTGGCCCTGGGTTGAGAGCACAATGGGACCATCCATCCCAGGAACCAGATCTCCT
CCCTCTGGTCCCGCCAGCCCAGACCTGGCCCCGGAAATCAGGATCAGAAATGGTCACAGC
AGACAGGTGTTCCAAGGGGAATGCAAAGGCAAGCTGTTATTACTGGCCCCATGGAAATCC
CCTAAGGCAATTCGAGCGTCAAGCATCCCAGCCGAATAAAAGCTTCCACACAATGGACAG
G--------//---------ATGGGCCGAA — Homo sapiens ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 14 (ADAMTS14), RefSeqGene on chromosome 10 — -168 / +231

siPARP2 + GFP-PARP2 WT : 45 clones

Use of the 3'-Pnt : 55.5% (25/45)

High Fidelity : 22.2% 10 clones

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA — X10

Deletions of the 3'Pnt : 31.1% 14 clones — **Size of the deletion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG-**TAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X3	-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTA**-CCCTATCTAGATATGAAA		-1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**--CCCTATCTAGATATGAAA	X4	-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG--**AT**CCCTATCTAGATATGAAA		-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**---CCCTATCTAGATATGAAA	X5	-3

Insertions without deletion : 2.2% 1 clone — **Size of the insertion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**TTCACACAGGAAACAGCTATGACATGAT
TACGAATTTAATACGACTCACTATAGGGAATTAACTTTCTGGTTTTTCAGTTCCTCGAGGA
GCTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGA
GGCCGAGGTCCCTATCTAGATATGAAA — **Intrachromosomal substrate** — +159

Deletions > 3'-Pnt : 44.4% (20/45)

Deletions : 40.0% 18 clones — **Size of the deletion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTA**--CCTATCTAGATATGAAA		-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---**AT**CCCTATCTAGATATGAAA		-3
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTA--------**T**CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-8
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACC----------TATCTAGATATGAAA		-10
CTAGAGCAACACGGAAGGAAT----------**T**CCCTATCTAGATATGAAA		-10
CTAGAGCAACACGGAAGGAAT----------CTATCTAGATATGAAA	X2	-13
CTAGAGCAACACGGAA----------TCTAGATATGAAA		-21
CTAGAGCAACACGGAA----------TCTAGATATGAAA		-21
CTAGA----------TATGAAA		-38
GCTGGCTAGC----------TAGATATGAAA		-42
GACCCAAGCT----------//----------AGATATGAAA		-50
TAATACGACT----------//----------AGATATGAAA		-71
GCGTGTACGG----------//----------ACCGATTCCT		-119
TACGACTCAC----------//----------GGGCCGAACC		-120
TTACGGTTCC----------//----------**T**CCCTATCTAGATATGAAA		deletion > 320pb
TCCCCGCGCG----------//----------**T**CCCTATCTAGATATGAAA		deletion > 320pb

Deletions/Insertions : **4.4%** **2 clones** **Size of the deletion/insertion**

CCCAAGCTGGT----------GATATGAAA		-49 / +1
CTAGAGCAACACTATATGCGCTCTAGTATTTAAGAATGTAGCAAGAATTTACTCTCAATTA AAGCTGGGTTCCATGATGAGAATGTAGTTAATAAATACCATAGGAAAGCTTATAAAGTAC TTTGAAGATAGGATGCAAGAGGACATGAAGTCCTTAACTATTTTCATGGATATATTTTGCC ATAATATTCTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCC CGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTG GAA----------//----------AATCAGCAGA	**Intrachromosomal substrate**	-339 / +294

siPARP2 + GFP-PARP2 E545A : 36 clones

Use of the 3'-Pnt : 55.5% (20/36)

High Fidelity : **25.0%** **9 clones**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA	X9	

Deletions of the 3'Pnt : **11.1%** **4 clones** **Size of the deletion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**--CCCTATCTAGATATGAAA	X2	-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG--**AT**CCCTATCTAGATATGAAA		-2
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG----CCCTATCTAGATATGAAA		-4

Insertions without deletion : **16.7%** **6 clones** **Size of the insertion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGG**TTAT**CCCTATCTAGATATGAAA		+1
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**GGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTG ACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAA TACGGTTATCCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	+97
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**TAGCACTCCTTCAGTAAGCCCTGAATTT GCGTACTTCTTGTGCCTTGGAGATGGTTATAAGGGGCTTTTTGTCCCAAAGAATAACTTTT GGTCTCAGCATGCTTTGCCTACGGTATGCCAGAGCTAATCCAGATTTCTTTCAGGAAAAAA ATTTAATAGATAATCAATAAAGATAAT CCCTATCTAGATATGAAA	Homo sapiens chromosome 5 clone CTC-427F23, complete sequence	+177
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGC TTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTT AATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAA TTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGT**TTAT**CCCT ATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	+205

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTA**GACCCTGGTTTCAGGGACGAGAATGGGTG AGCCCTAGACGCTCATGTAGGTGCCCTAGGAATGGTGACAAGGATGTCCATGAAGTGCTG TTTGTAAAAAGTGGGAAACCACTCGAGTGTTCACCAAAAGGGAGTGAATTCCTAGTGGGT GGTGGGTCCTTGCCGTGGACTCCTTTACAGCTTTAAAGGAAGGAACCCAAGCTCTATGCA TTAGAGCTGAAGAATGCAGTGTTGAATGGAAAAGTTAGCTGCATAATGACACATAGAATA **T**CCCTATCTAGATATGAAA	**Not found**	+269
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**GACATTTCATAGAAAAATTATTCTTTCA GGTTTTCAGGAACTGATGATTAAATGGTGCCAATGCCTAGCTTTTCTGAAGTTATCATCAA GTGAAAATTCTCTGAACTCCACAGGAGAAAGCTGAAGTCAAGTCACAATAACCATTCCTT TCTCCTACAAAAATGGGAATTTGCTGTTTGATTTTGTATGTGATTTAGAAATTTAAATCAG GTTTTCTGTAGTAGAACAGGGTTGGGATTAAAATTATATACCCAATTTTTAAGAAGTATGT AAAAACATATTCCTTGCAGCATCATTTGCAGTAGGGAAGAATGAAAGTAATCTAAATATC CATCAGTAGGGGACAGGCTAAATAATTCTGGTATATCCAGATGATGGAATGCTATGCAGT CACTGTCCCTATCTAGATATGAAA	Homo sapiens transient receptor potential cation channel subfamily C member 3 (TRPC3), RefSeqGene on chromosome 4	+397

Insertions with deletion of the 3'Pnt : **2.8%** **1 clone** **Size of the deletion/insertion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TT**CACATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTA TGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACA GCTATGACATGATTACGAATTTAATACGACTCACTATAGGGAATTAACTTTCTGGTTTTTC AGTTCCTCGAGGAGCTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCT GGAATAGCTCAGAGGCCGAG--CCCTATCTAGATATGAAA	**Intrachromosomal substrate**	-2 / +232

Deletions > 3'-Pnt : 44.4% (16/36)

Deletions : **36.1%** **13 clones** **Size of the deletion**

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**----CCTATCTAGATATGAAA		-4
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**TTAT**----ATCTAGATATGAAA		-4
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG**T**-------ATCTAGATATGAAA		-7
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC--------CTATCTAGATATGAAA	X2	-8
CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT---------ATCTAGATATGAAA		-9
GGCTAGCGCT----------ATCTAGATATGAAA		-36
GGCTAGCGCT----------ATCTAGATATGAAA		-38
CTAGAGCAACACG----------CCATGTAGTG		-42
ATTAATACG----------//----------CGCCATGTAG		-87
CGAAATTAAT----------//----------GTATTGACCG		-101
CGTGACTGGG----------//----------**T**CCCTATCTAGATATGAAA		deletion > 320pb
CGGTTTGACT----------//----------GGCCAGAGGC		-438

Deletions/Insertions : **8.3%** **3 clones** **Size of the deletion/insertion**

CTAGAGCT----------//----------CGATTCCTTG		-65 / +1
GACCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCGTCGGAACTCAGAAGTCGCTAATCGCCGACC AGTGCGATGGCACCCTGCACGCTGCTCCTGCTGTTGGCGGCCGCCCTGGCCCCCACTCAG ACCCGCGCGGGCCCACATTCGCTGAGGTATTTCGTCACCGCCG----------//---------- -TGTAGTGTAT	**Intrachromosomal substrate**	-68 / +232
CTAGT----------//----------GCTGGTGCTG		-324 / +1

BIBLIOGRAPHIE

Abbotts, R., and Wilson, D.M., 3rd (2016). Coordination of DNA single strand break repair. Free radical biology & medicine.
Abdel-Fatah, T., Sultana, R., Abbotts, R., Hawkes, C., Seedhouse, C., Chan, S., and Madhusudan, S. (2013). Clinicopathological and functional significance of XRCC1 expression in ovarian cancer. International journal of cancer *132*, 2778-2786.
Abujiang, P., Mori, T.J., Takahashi, T., Tanaka, F., Kasyu, I., Hitomi, S., and Hiai, H. (1998). Loss of heterozygosity (LOH) at 17q and 14q in human lung cancers. Oncogene *17*, 3029-3033.
Acs, K., Luijsterburg, M.S., Ackermann, L., Salomons, F.A., Hoppe, T., and Dantuma, N.P. (2011). The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. Nat Struct Mol Biol *18*, 1345-1350.
Adamson, B., Smogorzewska, A., Sigoillot, F.D., King, R.W., and Elledge, S.J. (2012). A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. Nat Cell Biol *14*, 318-328.
Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Wang, Z.-Q., Wagner, E.F., and Stark, G.R. (1997). Defective induction but normal activation and function of p53 in mouse cells lacking poly-ADP-ribose polymerase. Oncogene *15*.
Aguiar, R.C., Takeyama, K., He, C., Kreinbrink, K., and Shipp, M.A. (2005). B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity. J Biol Chem *280*, 33756-33765.
Ahel, D., Horejsi, Z., Wiechens, N., Polo, S.E., Garcia-Wilson, E., Ahel, I., Flynn, H., Skehel, M., West, S.C., Jackson, S.P.*, et al.* (2009). Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. Science *325*, 1240-1243.
Ahel, I., Ahel, D., Matsusaka, T., Clark, A.J., Pines, J., Boulton, S.J., and West, S.C. (2008). Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins. Nature *451*, 81-85.
Ahel, I., Fontana, P., Bonfiglio, J.J., Palazzo, L., Bartlett, E., and Matic, I. (2017). Serine ADP-ribosylation reversal by the hydrolase ARH3. eLife *6*, e28533.
Ahel, I., Rass, U., El-Khamisy, S.F., Katyal, S., Clements, P.M., McKinnon, P.J., Caldecott, K.W., and West, S.C. (2006). The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. Nature *443*, 713-716.
Ahmed, S., Bott, D., Gomez, A., Tamblyn, L., Rasheed, A., Cho, T., MacPherson, L., Sugamori, K.S., Yang, Y., Grant, D.M.*, et al.* (2015). Loss of the Mono-ADP-ribosyltransferase, Tiparp, Increases Sensitivity to Dioxin-induced Steatohepatitis and Lethality. J Biol Chem *290*, 16824-16840.
Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S.P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. Cell *124*, 301-313.
Ajimura, M., Leem, S.H., and Ogawa, H. (1993). Identification of new genes required for meiotic recombination in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *133*, 51-66.
Aka, P., Mateuca, R., Buchet, J.-P., Thierens, H., and Kirsch-Volders, M. (2004). Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis *556*, 169-181.
Akbari, M., Solvang-Garten, K., Hanssen-Bauer, A., Lieske, N.V., Pettersen, H.S., Pettersen, G.K., Wilson, D.M., 3rd, Krokan, H.E., and Otterlei, M. (2010). Direct interaction between XRCC1 and UNG2 facilitates rapid repair of uracil in DNA by XRCC1 complexes. DNA repair *9*, 785-795.
Al-Attar, A., Gossage, L., Fareed, K.R., Shehata, M., Mohammed, M., Zaitoun, A.M., Soomro, I., Lobo, D.N., Abbotts, R., Chan, S.*, et al.* (2010). Human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) is a prognostic factor in ovarian, gastro-oesophageal and pancreatico-biliary cancers. British journal of cancer *102*, 704-709.

Alani, E., Padmore, R., and Kleckner, N. (1990). Analysis of wild-type and rad50 mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. Cell *61*, 419-436.
Albert, J.M., Cao, C., Kim, K.W., Willey, C.D., Geng, L., Xiao, D., Wang, H., Sandler, A., Johnson, D.H., Colevas, A.D.*, et al.* (2007). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances cell death and improves tumor growth delay in irradiated lung cancer models. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *13*, 3033-3042.
Ali, A.A.E., Jukes, R.M., Pearl, L.H., and Oliver, A.W. (2009). Specific recognition of a multiply phosphorylated motif in the DNA repair scaffold XRCC1 by the FHA domain of human PNK. Nucleic Acids Research *37*, 1701-1712.
Alkhatib, H.M., Chen, D., Cherney, B., Bhatia, K., Notario, V., Giri, C., Stein, G., Slattery, E., Roeder, R.G., and Smulson, M.E. (1987). Cloning and expression of cDNA for human poly (ADP-ribose) polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences *84*, 1224-1228.
Altmeyer, M., Messner, S., Hassa, P.O., Fey, M., and Hottiger, M.O. (2009). Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. Nucleic Acids Research *37*, 3723-3738.
Altmeyer, M., Neelsen, K.J., Teloni, F., Pozdnyakova, I., Pellegrino, S., Grøfte, M., Rask, M.-B.D., Streicher, W., Jungmichel, S., Nielsen, M.L.*, et al.* (2015). Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose). Nature Communications *6*, 8088.
Alvarez-Gonzalez, R., and Jacobson, M.K. (1987). Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo. Biochemistry *26*, 3218-3224.
Ambatipudi, S., Gerstung, M., Gowda, R., Pai, P., Borges, A.M., Schäffer, A.A., Beerenwinkel, N., and Mahimkar, M.B. (2011). Genomic Profiling of Advanced-Stage Oral Cancers Reveals Chromosome 11q Alterations as Markers of Poor Clinical Outcome. PloS one *6*, e17250.
Ambrose, H.E., Willimott, S., Beswick, R.W., Dantzer, F., De Murcia, J.M., Yelamos, J., and Wagner, S.D. (2009). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1)-deficient mice demonstrate abnormal antibody responses. Immunology *127*, 178-186.
Amé, J.-C., Schreiber, V., Fraulob, V., Dollé, P., de Murcia, G., and Niedergang, C.P. (2001). A Bidirectional Promoter Connects the Poly(ADP-ribose) Polymerase 2 (PARP-2) Gene to the Gene for RNase P RNA: STRUCTURE AND EXPRESSION OF THE MOUSE PARP-2 GENE. Journal of Biological Chemistry *276*, 11092-11099.
Amé, J.-C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. BioEssays *26*, 882-893.
Ame, J.C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Hoger, T., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1999). PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. J Biol Chem *274*, 17860-17868.
Amon, J.D., and Koshland, D. (2016). RNase H enables efficient repair of R-loop induced DNA damage. eLife *5*, e20533.
An, J., Huang, Y.-C., Xu, Q.-Z., Zhou, L.-J., Shang, Z.-F., Huang, B., Wang, Y., Liu, X.-D., Wu, D.-C., and Zhou, P.-K. (2010). DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. BMC Molecular Biology *11*, 18.
Anand, R.P., Lovett, S.T., and Haber, J.E. (2013). Break-Induced DNA Replication. Cold Spring Harbor perspectives in biology *5*.
Anantha, R.W., Simhadri, S., Foo, T.K., Miao, S., Liu, J., Shen, Z., Ganesan, S., and Xia, B. (2017). Functional and mutational landscapes of BRCA1 for homology-directed repair and therapy resistance. eLife *6*, e21350.
Anderson, L.K., Reeves, A., Webb, L.M., and Ashley, T. (1999). Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. Genetics *151*, 1569-1579.

Andor, N., Graham, T.A., Jansen, M., Xia, L.C., Aktipis, C.A., Petritsch, C., Ji, H.P., and Maley, C.C. (2016). Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. Nat Med *22*, 105-113.
Andrabi, S.A., Kim, N.S., Yu, S.-W., Wang, H., Koh, D.W., Sasaki, M., Klaus, J.A., Otsuka, T., Zhang, Z., and Koehler, R.C. (2006). Poly (ADP-ribose)(PAR) polymer is a death signal. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 18308-18313.
Andrabi, S.A., Umanah, G.K., Chang, C., Stevens, D.A., Karuppagounder, S.S., Gagne, J.P., Poirier, G.G., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2014). Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, 10209-10214.
Andres, S.N., Appel, C.D., Westmoreland, J.W., Williams, J.S., Nguyen, Y., Robertson, P.D., Resnick, M.A., and Williams, R.S. (2015). Tetrameric Ctp1 coordinates DNA binding and DNA bridging in DNA double-strand-break repair. Nat Struct Mol Biol *22*, 158-166.
Andres, S.N., Vergnes, A., Ristic, D., Wyman, C., Modesti, M., and Junop, M. (2012). A human XRCC4-XLF complex bridges DNA. Nucleic Acids Res *40*, 1868-1878.
Ang, M.K., Patel, M.R., Yin, X.Y., Sundaram, S., Fritchie, K., Zhao, N., Liu, Y., Freemerman, A.J., Wilkerson, M.D., Walter, V.*, et al.* (2011). High XRCC1 protein expression is associated with poorer survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *17*, 6542-6552.
Aniukwu, J., Glickman, M.S., and Shuman, S. (2008). The pathways and outcomes of mycobacterial NHEJ depend on the structure of the broken DNA ends. Genes & Development *22*, 512-527.
Anne, S.L., Saudou, F., and Humbert, S. (2007). Phosphorylation of huntingtin by cyclin-dependent kinase 5 is induced by DNA damage and regulates wild-type and mutant huntingtin toxicity in neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *27*, 7318-7328.
Aravind, L., and Koonin, E.V. (2000). SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. Trends in biochemical sciences *25*, 112-114.
Arcus, V.L., McKenzie, J.L., Robson, J., and Cook, G.M. (2011). The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin–antitoxin array. Protein Engineering, Design and Selection *24*, 33-40.
Arnaudeau, C., Lundin, C., and Helleday, T. (2001). DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. J Mol Biol *307*, 1235-1245.
Atasheva, S., Frolova, E.I., and Frolov, I. (2014). Interferon-stimulated poly(ADP-Ribose) polymerases are potent inhibitors of cellular translation and virus replication. Journal of virology *88*, 2116-2130.
Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004b). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. The Journal of biological chemistry *279*, 55117-55126.
Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C.K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., Iacovoni, J.S., Daburon, V., Miller, K.M., Jackson, S.P.*, et al.* (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. Nat Struct Mol Biol *21*, 366-374.
Badie, S., Carlos, A.R., Folio, C., Okamoto, K., Bouwman, P., Jonkers, J., and Tarsounas, M. (2015). BRCA1 and CtIP promote alternative non-homologous end-joining at uncapped telomeres. Embo j *34*, 410-424.
Bai, P., Canto, C., Brunyanszki, A., Huber, A., Szanto, M., Cen, Y., Yamamoto, H., Houten, S.M., Kiss, B., Oudart, H.*, et al.* (2011a). PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. Cell Metab *13*, 450-460.
Bai, P., Canto, C., Oudart, H., Brunyanszki, A., Cen, Y., Thomas, C., Yamamoto, H., Huber, A., Kiss, B., Houtkooper, R.H.*, et al.* (2011b). PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. Cell Metab *13*, 461-468.
Bai, P., Houten, S.M., Huber, A., Schreiber, V., Watanabe, M., Kiss, B., de Murcia, G., Auwerx, J., and Murcia, J.M.-d. (2007). Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)-2 Controls Adipocyte

Differentiation and Adipose Tissue Function through the Regulation of the Activity of the Retinoid X Receptor/PPARγ Heterodimer. Journal of Biological Chemistry *282*, 37738-37746.
Baker, A.M., Fu, Q., Hayward, W., Lindsay, S.M., and Fletcher, T.M. (2009). The Myb/SANT domain of the telomere-binding protein TRF2 alters chromatin structure. Nucleic Acids Research *37*, 5019-5031.
Bakhoum, S.F., and Compton, D.A. (2012). Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. The Journal of clinical investigation *122*, 1138-1143.
Bakr, A., Köcher, S., Volquardsen, J., Reimer, R., Borgmann, K., Dikomey, E., Rothkamm, K., and Mansour, W.Y. (2016). Functional crosstalk between DNA damage response proteins 53BP1 and BRCA1 regulates double strand break repair choice. Radiotherapy and Oncology *119*, 276-281.
Balakrishnan, L., Brandt, P.D., Lindsey-Boltz, L.A., Sancar, A., and Bambara, R.A. (2009). Long Patch Base Excision Repair Proceeds via Coordinated Stimulation of the Multienzyme DNA Repair Complex. Journal of Biological Chemistry *284*, 15158-15172.
Barber, L.J., Sandhu, S., Chen, L., Campbell, J., Kozarewa, I., Fenwick, K., Assiotis, I., Rodrigues, D.N., Reis Filho, J.S., Moreno, V.*, et al.* (2013). Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor. The Journal of pathology *229*, 422-429.
Barkauskaite, E., Brassington, A., Tan, E.S., Warwicker, J., Dunstan, M.S., Banos, B., Lafite, P., Ahel, M., Mitchison, T.J., and Ahel, I. (2013). Visualization of poly (ADP-ribose) bound to PARG reveals inherent balance between exo-and endo-glycohydrolase activities. Nature communications *4*.
Barkauskaite, E., Jankevicius, G., and Ahel, I. (2015). Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation. Molecular Cell *58*, 935-946.
Barnes, D.E., and Lindahl, T. (2004). Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. Annu Rev Genet *38*, 445-476.
Barton, O., Naumann, S.C., Diemer-Biehs, R., Kunzel, J., Steinlage, M., Conrad, S., Makharashvili, N., Wang, J., Feng, L., Lopez, B.S.*, et al.* (2014). Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1. J Cell Biol *206*, 877-894.
Batar, B., Guven, G., Eroz, S., Bese, N.S., and Guven, M. (2016). Decreased DNA repair gene XRCC1 expression is associated with radiotherapy-induced acute side effects in breast cancer patients. Gene *582*, 33-37.
Becherel, O.J., Jakob, B., Cherry, A.L., Gueven, N., Fusser, M., Kijas, A.W., Peng, C., Katyal, S., McKinnon, P.J., Chen, J.*, et al.* (2010). CK2 phosphorylation-dependent interaction between aprataxin and MDC1 in the DNA damage response. Nucleic Acids Research *38*, 1489-1503.
Beck, C., Boehler, C., Guirouilh Barbat, J., Bonnet, M.E., Illuzzi, G., Ronde, P., Gauthier, L.R., Magroun, N., Rajendran, A., Lopez, B.S.*, et al.* (2014). PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. Nucleic Acids Res *42*, 5616-5632.
Belancio, V.P., Roy-Engel, A.M., and Deininger, P.L. (2010). All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. Seminars in cancer biology *20*, 200-210.
Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., and Stark, J.M. (2008). Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair. PLoS genetics *4*, e1000110.
Berghammer, H., Ebner, M., Marksteiner, R., and Auer, B. (1999). pADPRT-2: a novel mammalian polymerizing (ADP-ribosyl) transferase gene related to truncated pADPRT homologues in plants and Caenorhabditis elegans 1. FEBS letters *449*, 259-263.
Bergs, J.W., Krawczyk, P.M., Borovski, T., ten Cate, R., Rodermond, H.M., Stap, J., Medema, J.P., Haveman, J., Essers, J., van Bree, C.*, et al.* (2013). Inhibition of homologous recombination by hyperthermia shunts early double strand break repair to non-homologous end-joining. DNA Repair (Amst) *12*, 38-45.

Bernstein, N.K., Williams, R.S., Rakovszky, M.L., Cui, D., Green, R., Karimi-Busheri, F., Mani, R.S., Galicia, S., Koch, C.A., Cass, C.E.*, et al.* (2005). The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase. Mol Cell *17*, 657-670.
Berquist, B.R., Singh, D.K., Fan, J., Kim, D., Gillenwater, E., Kulkarni, A., Bohr, V.A., Ackerman, E.J., Tomkinson, A.E., and Wilson, D.M., 3rd (2010a). Functional capacity of XRCC1 protein variants identified in DNA repair-deficient Chinese hamster ovary cell lines and the human population. Nucleic Acids Res *38*, 5023-5035.
Berquist, B.R., Singh, D.K., Fan, J., Kim, D., Gillenwater, E., Kulkarni, A., Bohr, V.A., Ackerman, E.J., Tomkinson, A.E., and Wilson, I.I.I.D.M. (2010b). Functional capacity of XRCC1 protein variants identified in DNA repair-deficient Chinese hamster ovary cell lines and the human population. Nucleic Acids Research *38*, 5023-5035.
Berti, M., Ray Chaudhuri, A., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R.*, et al.* (2013). Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. Nat Struct Mol Biol *20*, 347-354.
Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A.A., Krempler, A., Jeggo, P.A., and Lobrich, M. (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. Embo j *28*, 3413-3427.
Bhargava, R., Carson, C.R., Lee, G., and Stark, J.M. (2017). Contribution of canonical nonhomologous end joining to chromosomal rearrangements is enhanced by ATM kinase deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A *114*, 728-733.
Bick, M.J., Carroll, J.W., Gao, G., Goff, S.P., Rice, C.M., and MacDonald, M.R. (2003). Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. Journal of virology *77*, 11555-11562.
Biehs, R., Steinlage, M., Barton, O., Juhász, S., Künzel, J., Spies, J., Shibata, A., Jeggo, P.A., and Löbrich, M. (2017). DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. Molecular Cell *65*, 671-684.e675.
Birkbak, N.J., Eklund, A.C., Li, Q., McClelland, S.E., Endesfelder, D., Tan, P., Tan, I.B., Richardson, A.L., Szallasi, Z., and Swanton, C. (2011). Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. Cancer research *71*, 3447-3452.
Bjorkqvist, A.M., Wolf, M., Nordling, S., Tammilehto, L., Knuuttila, A., Kere, J., Mattson, K., and Knuutila, S. (1999). Deletions at 14q in malignant mesothelioma detected by microsatellite marker analysis. British journal of cancer *81*, 1111-1115.
Black, S.J., Kashkina, E., Kent, T., and Pomerantz, R.T. (2016). DNA Polymerase theta: A Unique Multifunctional End-Joining Machine. Genes *7*.
Blander, G., and Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. Annual review of biochemistry *73*, 417-435.
Blier, P.R., Griffith, A.J., Craft, J., and Hardin, J.A. (1993). Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. J Biol Chem *268*, 7594-7601.
Boboila, C., Oksenych, V., Gostissa, M., Wang, J.H., Zha, S., Zhang, Y., Chai, H., Lee, C.S., Jankovic, M., Saez, L.M.*, et al.* (2012). Robust chromosomal DNA repair via alternative end-joining in the absence of X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, 2473-2478.
Boboila, C., Yan, C., Wesemann, D.R., Jankovic, M., Wang, J.H., Manis, J., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M., and Alt, F.W. (2010). Alternative end-joining catalyzes class switch recombination in the absence of both Ku70 and DNA ligase 4. J Exp Med *207*, 417-427.
Boehler, C., Gauthier, L.R., Mortusewicz, O., Biard, D.S., Saliou, J.-M., Bresson, A., Sanglier-Cianferani, S., Smith, S., Schreiber, V., Boussin, F.*, et al.* (2011a). Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 2783-2788.

Boersma, V., Moatti, N., Segura-Bayona, S., Peuscher, M.H., van der Torre, J., Wevers, B.A., Orthwein, A., Durocher, D., and Jacobs, J.J. (2015a). MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection. Nature *521*, 537-540.
Bolin, C., Boudra, M.T., Fernet, M., Vaslin, L., Pennaneach, V., Zaremba, T., Biard, D., Cordelieres, F.P., Favaudon, V., Megnin-Chanet, F.*, et al.* (2012). The impact of cyclin-dependent kinase 5 depletion on poly(ADP-ribose) polymerase activity and responses to radiation. Cell Mol Life Sci *69*, 951-962.
Bonfiglio, J.J., Fontana, P., Zhang, Q., Colby, T., Gibbs-Seymour, I., Atanassov, I., Bartlett, E., Zaja, R., Ahel, I., and Matic, I. (2017). Serine ADP-Ribosylation Depends on HPF1. Mol Cell *65*, 932-940.e936.
Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F., and Koonin, E.V. (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *11*, 68-76.
Bothmer, A., Robbiani, Davide F., Di Virgilio, M., Bunting, Samuel F., Klein, Isaac A., Feldhahn, N., Barlow, J., Chen, H.-T., Bosque, D., Callen, E.*, et al.* (2011). Regulation of DNA End Joining, Resection, and Immunoglobulin Class Switch Recombination by 53BP1. Molecular Cell *42*, 319-329.
Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.E., Thompson, J.R., Chen, J., and Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. Cell *127*, 1361-1373.
Boudra, M.T., Bolin, C., Chiker, S., Fouquin, A., Zaremba, T., Vaslin, L., Biard, D., Cordelieres, F.P., Megnin-Chanet, F., Favaudon, V.*, et al.* (2015). PARP-2 depletion results in lower radiation cell survival but cell line-specific differences in poly(ADP-ribose) levels. Cell Mol Life Sci *72*, 1585-1597.
Boulton, S.J., and Jackson, S.P. (1996). Identification of a Saccharomyces cerevisiae Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. Nucleic Acids Res *24*, 4639-4648.
Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q.*, et al.* (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. Nat Struct Mol Biol *17*, 688-695.
Bradley, M.O., and Kohn, K.W. (1979). X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. Nucleic Acids Res *7*, 793-804.
BREDEHORST, R., WIELCKENS, K., ADAMIETZ, P., STEINHAGEN-THIESSEN, E., and HILZ, H. (1981). Mono (ADP-ribosyl) ation and Poly (ADP-ribosyl) ation of Proteins in Developing Liver and in Hepatomas. European Journal of Biochemistry *120*, 267-274.
Breslin, C., Hornyak, P., Ridley, A., Rulten, S.L., Hanzlikova, H., Oliver, A.W., and Caldecott, K.W. (2015). The XRCC1 phosphate-binding pocket binds poly (ADP-ribose) and is required for XRCC1 function. Nucleic Acids Res *43*, 6934-6944.
Britton, S., Coates, J., and Jackson, S.P. (2013). A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair. The Journal of Cell Biology *202*, 579-595.
Brochu, G., Duchaine, C., Thibeault, L., Lagueux, J., Shah, G.M., and Poirier, G.G. (1994). Mode of action of poly (ADP-ribose) glycohydrolase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression *1219*, 342-350.
Bruner, S.D., Norman, D.P., and Verdine, G.L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. Nature *403*, 859-866.
Bryant, H.E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A.S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P., and Helleday, T. (2009). PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. EMBO J *28*, 2601-2615.
Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. Nature *434*, 913-917.

Bunting, S.F., Callen, E., Kozak, M.L., Kim, J.M., Wong, N., Lopez-Contreras, A.J., Ludwig, T., Baer, R., Faryabi, R.B., Malhowski, A.*, et al.* (2012). BRCA1 functions independently of homologous recombination in DNA interstrand crosslink repair. Mol Cell *46*, 125-135.
Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L.*, et al.* (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. Cell *141*, 243-254.
Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. J Biol Chem *276*.
Burzio, L., Riquelme, P., and Koide, S. (1979). ADP ribosylation of rat liver nucleosomal core histones. Journal of Biological Chemistry *254*, 3029-3037.
Caldecott, K.W. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. DNA repair *2*, 955-969.
Caldecott, K.W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. Nature reviews Genetics *9*, 619-631.
Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P., and Shall, S. (1996a). XRCC1 Polypeptide Interacts with DNA Polymerase β and Possibly Poly (ADP-Ribose) Polymerase, and DNA Ligase III Is a Novel Molecular 'Nick-Sensor' In Vitro. Nucleic Acids Research *24*, 4387-4394.
Caldecott, K.W., Tucker, J.D., Stanker, L.H., and Thompson, L.H. (1995). Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. Nucleic Acids Res *23*, 4836-4843.
Callen, E., Di Virgilio, M., Kruhlak, M.J., Nieto-Soler, M., Wong, N., Chen, H.T., Faryabi, R.B., Polato, F., Santos, M., Starnes, L.M.*, et al.* (2013). 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. Cell *153*, 1266-1280.
Cammas, F., Herzog, M., Lerouge, T., Chambon, P., and Losson, R. (2004). Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. Genes Dev *18*, 2147-2160.
Campalans, A., Kortulewski, T., Amouroux, R., Menoni, H., Vermeulen, W., and Radicella, J.P. (2013). Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair. Nucleic Acids Res *41*, 3115-3129.
Campalans, A., Marsin, S., Nakabeppu, Y., O'Connor, T.R., Boiteux, S., and Radicella, J.P. (2005). XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: a model for its recruitment to base excision repair. DNA repair *4*, 826-835.
Campalans, A., Moritz, E., Kortulewski, T., Biard, D., Epe, B., and Radicella, J.P. (2015). Interaction with OGG1 is required for efficient recruitment of XRCC1 to base excision repair and maintenance of genetic stability after exposure to oxidative stress. Mol Cell Biol *35*, 1648-1658.
Cannavo, E., and Cejka, P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. Nature *514*, 122-125.
Cannon, B., Kuhnlein, J., Yang, S.-H., Cheng, A., Schindler, D., Stark, J.M., Russell, R., and Paull, T.T. (2013). Visualization of local DNA unwinding by Mre11/Rad50/Nbs1 using single-molecule FRET. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 18868-18873.
Cao, L., Alani, E., and Kleckner, N. (1990). A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in S. cerevisiae. Cell *61*, 1089-1101.
Cao, L., Xu, X., Bunting, S.F., Liu, J., Wang, R.-H., Cao, L.L., Wu, J.J., Peng, T.-N., Chen, J., Nussenzweig, A.*, et al.* (2009). A Selective Requirement for 53BP1 in the Biological Response to Genomic Instability Induced by Brca1 Deficiency. Molecular Cell *35*, 534-541.
Cappelli, E., Taylor, R., Cevasco, M., Abbondandolo, A., Caldecott, K., and Frosina, G. (1997). Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. J Biol Chem *272*, 23970-23975.

Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R., 3rd, Hays, L., Morgan, W.F., and Petrini, J.H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. Cell *93*, 477-486.
Carreira, A., Hilario, J., Amitani, I., Baskin, R.J., Shivji, M.K.K., Venkitaraman, A.R., and Kowalczykowski, S.C. (2009). The BRC Repeats of BRCA2 Modulate the DNA-Binding Selectivity of RAD51. Cell *136*, 1032-1043.
Carter-O'Connell, I., and Cohen, M.S. (2015). Identifying Direct Protein Targets of Poly-ADP-Ribose Polymerases (PARPs) Using Engineered PARP Variants-Orthogonal Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD+) Analog Pairs. Curr Protoc Chem Biol *7*, 121-139.
Carter-O'Connell, I., Jin, H., Morgan, R.K., David, L.L., and Cohen, M.S. (2014). Engineering the Substrate Specificity of ADP-Ribosyltransferases for Identifying Direct Protein Targets. Journal of the American Chemical Society *136*, 5201-5204.
Carvalho, S., Vitor, A.C., Sridhara, S.C., Martins, F.B., Raposo, A.C., Desterro, J.M., Ferreira, J., and de Almeida, S.F. (2014). SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint. eLife *3*, e02482.
Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A.D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. Trends in cell biology *26*, 52-64.
Chalkiadaki, A., and Guarente, L. (2015). The multifaceted functions of sirtuins in cancer. Nat Rev Cancer *15*, 608-624.
Chambon, P., Weill, J.D., and Mandel, P. (1963). Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. Biochemical and biophysical research communications *11*, 39-43.
Chan, D.W., Chen, B.P.-C., Prithivirajsingh, S., Kurimasa, A., Story, M.D., Qin, J., and Chen, D.J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. Genes & Development *16*, 2333-2338.
Chan, S.H., Yu, A.M., and McVey, M. (2010). Dual roles for DNA polymerase theta in alternative end-joining repair of double-strand breaks in Drosophila. PLoS genetics *6*, e1001005.
Chang, H.-C., and Guarente, L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. Trends in Endocrinology & Metabolism *25*, 138-145.
Chang, P., Coughlin, M., and Mitchison, T.J. (2005). Tankyrase-1 polymerization of poly (ADP-ribose) is required for spindle structure and function. Nature cell biology *7*, 1133-1139.
Chanut, P., Britton, S., Coates, J., Jackson, S.P., and Calsou, P. (2016). Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. Nature Communications *7*, 12889.
Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A.A., Adams, I.R., Batista, F.D., and Boulton, S.J. (2013). RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. Mol Cell *49*, 858-871.
Chaturvedi, P., Eng, W.K., Zhu, Y., Mattern, M.R., Mishra, R., Hurle, M.R., Zhang, X., Annan, R.S., Lu, Q., Faucette, L.F*., et al.* (1999). Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. Oncogene *18*, 4047-4054.
Chen, J., Ghorai, M.K., Kenney, G., and Stubbe, J. (2008a). Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. Nucleic Acids Research *36*, 3781-3790.
Chen, L., Nievera, C.J., Lee, A.Y., and Wu, X. (2008b). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. J Biol Chem *283*, 7713-7720.
Chen, P.-L., Chen, C.-F., Chen, Y., Xiao, J., Sharp, Z.D., and Lee, W.-H. (1998). The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. Proceedings of the National Academy of Sciences *95*, 5287-5292.

Chen, P.L., Liu, F., Cai, S., Lin, X., Li, A., Chen, Y., Gu, B., Lee, E.Y., and Lee, W.H. (2005). Inactivation of CtIP leads to early embryonic lethality mediated by G1 restraint and to tumorigenesis by haploid insufficiency. Mol Cell Biol *25*, 3535-3542.
Cherney, B.W., McBride, O.W., Chen, D., Alkhatib, H., Bhatia, K., Hensley, P., and Smulson, M.E. (1987). cDNA sequence, protein structure, and chromosomal location of the human gene for poly (ADP-ribose) polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences *84*, 8370-8374.
Cheung-Ong, K., Giaever, G., and Nislow, C. (2013). DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. Chemistry & Biology *20*, 648-659.
Chi, Y., Welcker, M., Hizli, A.A., Posakony, J.J., Aebersold, R., and Clurman, B.E. (2008). Identification of CDK2 substrates in human cell lysates. Genome Biol *9*, R149.
Chiker, S., Pennaneach, V., Loew, D., Dingli, F., Biard, D., Cordelieres, F.P., Gemble, S., Vacher, S., Bieche, I., Hall, J.*, et al.* (2015). Cdk5 promotes DNA replication stress checkpoint activation through RPA-32 phosphorylation, and impacts on metastasis free survival in breast cancer patients. Cell Cycle *14*, 3066-3078.
Chiou, S.-H., Jiang, B.-H., Yu, Y.-L., Chou, S.-J., Tsai, P.-H., Chang, W.-C., Chen, L.-K., Chen, L.-H., Chien, Y., and Chiou, G.-Y. (2012). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates nuclear reprogramming and promotes iPSC generation without c-Myc. The Journal of Experimental Medicine.
Chiruvella, K.K., Liang, Z., and Wilson, T.E. (2013). Repair of double-strand breaks by end joining. Cold Spring Harbor perspectives in biology *5*, a012757.
Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiacovo, M.P., and Elledge, S.J. (2010). A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 18475-18480.
Chou, W.C., Wang, H.C., Wong, F.H., Ding, S.L., Wu, P.E., Shieh, S.Y., and Shen, C.Y. (2008). Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair. Embo j *27*, 3140-3150.
Chroma, K., Mistrik, M., Moudry, P., Gursky, J., Liptay, M., Strauss, R., Skrott, Z., Vrtel, R., Bartkova, J., Kramara, J.*, et al.* (2017). Tumors overexpressing RNF168 show altered DNA repair and responses to genotoxic treatments, genomic instability and resistance to proteotoxic stress. Oncogene *36*, 2405-2422.
Ciccarone, F., Zampieri, M., and Caiafa, P. (2017). PARP1 orchestrates epigenetic events setting up chromatin domains. Seminars in cell & developmental biology *63*, 123-134.
Cistulli, C., Lavrik, O.I., Prasad, R., Hou, E., and Wilson, S.H. (2004). AP endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase-1 interact with the same base excision repair intermediate. DNA repair *3*, 581-591.
Claybon, A., Karia, B., Bruce, C., and Bishop, A.J.R. (2010). PARP1 suppresses homologous recombination events in mice in vivo. Nucleic Acids Research *38*, 7538-7545.
Cleaver, J.E., Bodell, W.J., Morgan, W.F., and Zelle, B. (1983). Differences in the regulation by poly(ADP-ribose) of repair of DNA damage from alkylating agents and ultraviolet light according to cell type. The Journal of biological chemistry *258*, 9059-9068.
Clements, P.M., Breslin, C., Deeks, E.D., Byrd, P.J., Ju, L., Bieganowski, P., Brenner, C., Moreira, M.C., Taylor, A.M., and Caldecott, K.W. (2004b). The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair proteins XRCC1 and XRCC4. DNA Repair (Amst) *3*, 1493-1502.
Clerici, M., Mantiero, D., Guerini, I., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2008). The Yku70–Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle. EMBO reports *9*, 810.
Cock, T.A., Houten, S.M., and Auwerx, J. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-γ: too much of a good thing causes harm. EMBO reports *5*, 142-147.

Colicchia, V., Petroni, M., Guarguaglini, G., Sardina, F., Sahun-Roncero, M., Carbonari, M., Ricci, B., Heil, C., Capalbo, C., Belardinilli, F.*, et al.* (2017). PARP inhibitors enhance replication stress and cause mitotic catastrophe in MYCN-dependent neuroblastoma. Oncogene.
Cooper, M.P., Machwe, A., Orren, D.K., Brosh, R.M., Ramsden, D., and Bohr, V.A. (2000). Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. Genes Dev *14*, 907-912.
Corda, D., and Di Girolamo, M. (2003). Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. The EMBO Journal *22*, 1953.
Cornetta, T., Festa, F., Testa, A., and Cozzi, R. (2006). DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics *66*, 537-545.
Corso, G., Marrelli, D., Pedrazzani, C., Machado, J.C., Mancini, S., Seruca, R., and Roviello, F. (2009). Gastric cardia carcinoma is associated with the promoter -77T>C gene polymorphism of X-ray cross-complementing group 1 (XRCC1). Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract *13*, 2233-2238.
Cortez, D. (2015). Preventing replication fork collapse to maintain genome integrity. DNA Repair (Amst) *32*, 149-157.
Costantini, S., Woodbine, L., Andreoli, L., Jeggo, P.A., and Vindigni, A. (2007). Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. DNA Repair (Amst) *6*, 712-722.
Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Doksani, Y., Lopes, M., Sogo, J., and Foiani, M. (2005). Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. Molecular cell *17*, 153-159.
Courilleau, C., Chailleux, C., Jauneau, A., Grimal, F., Briois, S., Boutet-Robinet, E., Boudsocq, F., Trouche, D., and Canitrot, Y. (2012). The chromatin remodeler p400 ATPase facilitates Rad51-mediated repair of DNA double-strand breaks. The Journal of Cell Biology *199*, 1067-1081.
Croce, C.M., Isobe, M., Palumbo, A., Puck, J., Ming, J., Tweardy, D., Erikson, J., Davis, M., and Rovera, G. (1985). Gene for alpha-chain of human T-cell receptor: location on chromosome 14 region involved in T-cell neoplasms. Science *227*, 1044-1047.
Cruz-Garcia, A., Lopez-Saavedra, A., and Huertas, P. (2014). BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. Cell Rep *9*, 451-459.
Cuneo, M.J., and London, R.E. (2010). Oxidation state of the XRCC1 N-terminal domain regulates DNA polymerase β binding affinity. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 6805-6810.
Daboussi, F., Courbet, S., Benhamou, S., Kannouche, P., Zdzienicka, M.Z., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2008). A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. Journal of cell science *121*, 162-166.
Dale Rein, I., Solberg Landsverk, K., Micci, F., Patzke, S., and Stokke, T. (2015). Replication-induced DNA damage after PARP inhibition causes G2 delay, and cell line-dependent apoptosis, necrosis and multinucleation. Cell Cycle *14*, 3248-3260.
Dan, J., Liu, Y., Liu, N., Chiourea, M., Okuka, M., Wu, T., Ye, X., Mou, C., Wang, L., Wang, L.*, et al.* (2014). Rif1 maintains telomere length homeostasis of ESCs by mediating heterochromatin silencing. Developmental cell *29*, 7-19.
Daniels, C.M., Ong, S.-E., and Leung, A.K. (2014). Phosphoproteomic approach to characterize protein mono-and poly (ADP-ribosyl) ation sites from cells. Journal of proteome research *13*, 3510-3522.
Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. Biochemistry *39*, 7559-7569.
Dantzer, F., Giraud-Panis, M.-J., Jaco, I., Amé, J.-C., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C.-E., Gilson, E., Ménissier-de Murcia, J., de Murcia, G.*, et al.* (2004). Functional Interaction between Poly(ADP-Ribose)

Polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP Activity Negatively Regulates TRF2. Molecular and Cellular Biology *24*, 1595-1607.
Dantzer, F., Mark, M., Quenet, D., Scherthan, H., Huber, A., Liebe, B., Monaco, L., Chicheportiche, A., Sassone-Corsi, P., de Murcia, G.*, et al.* (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 14854-14859.
DaRosa, P.A., Wang, Z., Jiang, X., Pruneda, J.N., Cong, F., Klevit, R.E., and Xu, W. (2015). Allosteric activation of the RNF146 ubiquitin ligase by a poly(ADP-ribosyl)ation signal. Nature *517*, 223-226.
Das, B.B., Antony, S., Gupta, S., Dexheimer, T.S., Redon, C.E., Garfield, S., Shiloh, Y., and Pommier, Y. (2009). Optimal function of the DNA repair enzyme TDP1 requires its phosphorylation by ATM and/or DNA-PK. Embo j *28*, 3667-3680.
Das, B.B., Huang, S.Y., Murai, J., Rehman, I., Ame, J.C., Sengupta, S., Das, S.K., Majumdar, P., Zhang, H., Biard, D.*, et al.* (2014). PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. Nucleic Acids Res *42*, 4435-4449.
Date, H., Onodera, O., Tanaka, H., Iwabuchi, K., Uekawa, K., Igarashi, S., Koike, R., Hiroi, T., Yuasa, T., Awaya, Y.*, et al.* (2001). Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. Nature genetics *29*, 184-188.
Davies, O.R., Forment, J.V., Sun, M., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Galanty, Y., Demir, M., Morton, C.R., Rzechorzek, N.J., Jackson, S.P.*, et al.* (2015). CtIP tetramer assembly is required for DNA-end resection and repair. Nat Struct Mol Biol *22*, 150-157.
Day, T.A., Layer, J.V., Cleary, J.P., Guha, S., Stevenson, K.E., Tivey, T., Kim, S., Schinzel, A.C., Izzo, F., Doench, J.*, et al.* (2017). PARP3 is a promoter of chromosomal rearrangements and limits G4 DNA. Nature Communications *8*, 15110.
De Bont, R., and Van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. Mutagenesis *19*, 169-185.
de Jager, M., Dronkert, M.L., Modesti, M., Beerens, C.E., Kanaar, R., and van Gent, D.C. (2001a). DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. Nucleic Acids Res *29*, 1317-1325.
de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R., and Wyman, C. (2001b). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. Mol Cell *8*, 1129-1135.
De Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., and LeMeur, M. (1997a). Requirement of poly (ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *94*, 7303-7307.
de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Della-Maria, J., Hegde, M.L., McNeill, D.R., Matsumoto, Y., Tsai, M.-S., Ellenberger, T., Wilson, D.M., Mitra, S., and Tomkinson, A.E. (2012). The Interaction between Polynucleotide Kinase Phosphatase and the DNA Repair Protein XRCC1 Is Critical for Repair of DNA Alkylation Damage and Stable Association at DNA Damage Sites. Journal of Biological Chemistry *287*, 39233-39244.
Della-Maria, J., Zhou, Y., Tsai, M.S., Kuhnlein, J., Carney, J.P., Paull, T.T., and Tomkinson, A.E. (2011). Human Mre11/human Rad50/Nbs1 and DNA ligase IIIalpha/XRCC1 protein complexes act together in an alternative nonhomologous end joining pathway. J Biol Chem *286*, 33845-33853.
Demple, B., and Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. Annual review of biochemistry *63*, 915-948.
Deng, C.-X., and Brodie, S.G. (2000). Roles of BRCA1 and its interacting proteins. BioEssays *22*, 728-737.
Densham, R.M., Garvin, A.J., Stone, H.R., Strachan, J., Baldock, R.A., Daza-Martin, M., Fletcher, A., Blair-Reid, S., Beesley, J., Johal, B.*, et al.* (2016). Human BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase activity counteracts chromatin barriers to DNA resection. Nat Struct Mol Biol *23*, 647-655.

Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., and Gygi, S.P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 10762-10767.
Derbyshire, D.J., Basu, B.P., Serpell, L.C., Joo, W.S., Date, T., Iwabuchi, K., and Doherty, A.J. (2002). Crystal structure of human 53BP1 BRCT domains bound to p53 tumour suppressor. The EMBO Journal *21*, 3863.
Di Girolamo, M., Dani, N., Stilla, A., and Corda, D. (2005). Physiological relevance of the endogenous mono (ADP-ribosyl) ation of cellular proteins. FEBS journal *272*, 4565-4575.
Di Virgilio, M., Callen, E., Yamane, A., Zhang, W., Jankovic, M., Gitlin, A.D., Feldhahn, N., Resch, W., Oliveira, T.Y., Chait, B.T.*, et al.* (2013). Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. Science *339*, 711-715.
Dianova, I.I., Sleeth, K.M., Allinson, S.L., Parsons, J.L., Breslin, C., Caldecott, K.W., and Dianov, G.L. (2004). XRCC1–DNA polymerase β interaction is required for efficient base excision repair. Nucleic Acids Research *32*, 2550-2555.
Difilippantonio, M.J., Zhu, J., Chen, H.T., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., Max, E.E., Ried, T., and Nussenzweig, A. (2000). DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. Nature *404*, 510-514.
Difilippantonio, S., Gapud, E., Wong, N., Huang, C.Y., Mahowald, G., Chen, H.T., Kruhlak, M.J., Callen, E., Livak, F., Nussenzweig, M.C.*, et al.* (2008). 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination. Nature *456*, 529-533.
Dinant, C., de Jager, M., Essers, J., van Cappellen, W.A., Kanaar, R., Houtsmuller, A.B., and Vermeulen, W. (2007). Activation of multiple DNA repair pathways by sub-nuclear damage induction methods. Journal of cell science *120*, 2731-2740.
Ding, R., Pommier, Y., Kang, V.H., and Smulson, M. (1992). Depletion of poly (ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining. Journal of Biological Chemistry *267*, 12804-12812.
DiTullio, R.A., Jr., Mochan, T.A., Venere, M., Bartkova, J., Sehested, M., Bartek, J., and Halazonetis, T.D. (2002). 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. Nat Cell Biol *4*, 998-1002.
Dizdaroglu, M., Coskun, E., and Jaruga, P. (2017). Repair of oxidatively induced DNA damage by DNA glycosylases: Mechanisms of action, substrate specificities and excision kinetics. Mutation research *771*, 99-127.
Do, A.T., Brooks, J.T., Le Neveu, M.K., and LaRocque, J.R. (2014). Double-Strand Break Repair Assays Determine Pathway Choice and Structure of Gene Conversion Events in Drosophila melanogaster. G3: Genes|Genomes|Genetics *4*, 425-432.
Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J.*, et al.* (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. Cell *136*, 435-446.
Dong, F., Soubeyrand, S., and Hache, R.J. (2010). Activation of PARP-1 in response to bleomycin depends on the Ku antigen and protein phosphatase 5. Oncogene *29*, 2093-2103.
Dorand, R.D., Nthale, J., Myers, J.T., Barkauskas, D.S., Avril, S., Chirieleison, S.M., Pareek, T.K., Abbott, D.W., Stearns, D.S., Letterio, J.J.*, et al.* (2016). Cdk5 disruption attenuates tumor PD-L1 expression and promotes antitumor immunity. Science *353*, 399-403.
Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J.F. (1998). Rates of Spontaneous Mutation. Genetics *148*, 1667.
Drané, P., Brault, M.-E., Cui, G., Meghani, K., Chaubey, S., Detappe, A., Parnandi, N., He, Y., Zheng, X.-F., Botuyan, M.V.*, et al.* (2017). TIRR regulates 53BP1 by masking its histone methyl-lysine binding function. Nature *543*, 211-216.

Drost, R., Bouwman, P., Rottenberg, S., Boon, U., Schut, E., Klarenbeek, S., Klijn, C., van der Heijden, I., van der Gulden, H., Wientjens, E.*, et al.* (2011). BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance. Cancer cell *20*, 797-809.
Du, Y., Yamaguchi, H., Wei, Y., Hsu, J.L., Wang, H.L., Hsu, Y.H., Lin, W.C., Yu, W.H., Leonard, P.G., Lee, G.R.t.*, et al.* (2016). Blocking c-Met-mediated PARP1 phosphorylation enhances anti-tumor effects of PARP inhibitors. Nat Med *22*, 194-201.
Dunstan, M.S., Barkauskaite, E., Lafite, P., Knezevic, C.E., Brassington, A., Ahel, M., Hergenrother, P.J., Leys, D., and Ahel, I. (2012). Structure and mechanism of a canonical poly (ADP-ribose) glycohydrolase. Nature communications *3*, 878.
DURKACZ, B.W., IRWIN, J., and SHALL, S. (1981). The effect of inhibition of (ADP-ribose) n biosynthesis on DNA repair assayed by the nucleoid technique. European Journal of Biochemistry *121*, 65-69.
Durkacz, B.W., Omidiji, O., Gray, D.A., and Shall, S. (1980). (ADP-ribose)n participates in DNA excision repair. Nature *283*, 593-596.
Durmus, S., Sparidans, R.W., van Esch, A., Wagenaar, E., Beijnen, J.H., and Schinkel, A.H. (2015). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-GP/ABCB1) restrict oral availability and brain accumulation of the PARP inhibitor rucaparib (AG-014699). Pharmaceutical research *32*, 37-46.
Durocher, D., Taylor, I.A., Sarbassova, D., Haire, L.F., Westcott, S.L., Jackson, S.P., Smerdon, S.J., and Yaffe, M.B. (2000). The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. Mol Cell *6*, 1169-1182.
Edwards, S.L., Brough, R., Lord, C.J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D.A., Boyd, J., Reis-Filho, J.S., and Ashworth, A. (2008). Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. Nature *451*, 1111-1115.
El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., and Caldecott, K.W. (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. Nucleic Acids Res *31*, 5526-5533.
El-Khamisy, S.F., Saifi, G.M., Weinfeld, M., Johansson, F., Helleday, T., Lupski, J.R., and Caldecott, K.W. (2005a). Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. Nature *434*, 108-113.
El-Shemerly, M., Hess, D., Pyakurel, A.K., Moselhy, S., and Ferrari, S. (2008). ATR-dependent pathways control hEXO1 stability in response to stalled forks. Nucleic acids research *36*, 511-519.
Eliasson, M.J., Sampei, K., Mandir, A.S., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z.-Q., Dawson, T.M., and Snyder, S.H. (1997). Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. Nature medicine *3*, 1089-1095.
Elliott, B., Richardson, C., and Jasin, M. (2005). Chromosomal Translocation Mechanisms at Intronic Alu Elements in Mammalian Cells. Molecular Cell *17*, 885-894.
Endres, M., Wang, Z.-Q., Namura, S., Waeber, C., and Moskowitz, M.A. (1997). Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly (ADP-ribose) polymerase. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism *17*, 1143-1151.
Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T., Tkac, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D.*, et al.* (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. Mol Cell *49*, 872-883.
Esposito, M.T., Zhao, L., Fung, T.K., Rane, J.K., Wilson, A., Martin, N., Gil, J., Leung, A.Y., Ashworth, A., and So, C.W. (2015). Synthetic lethal targeting of oncogenic transcription factors in acute leukemia by PARP inhibitors. Nat Med *21*, 1481-1490.
Eustermann, S., Brockmann, C., Mehrotra, P.V., Yang, J.C., Loakes, D., West, S.C., Ahel, I., and Neuhaus, D. (2010). Solution structures of the two PBZ domains from human APLF and their interaction with poly(ADP-ribose). Nat Struct Mol Biol *17*, 241-243.

Eustermann, S., Videler, H., Yang, J.-C., Cole, P.T., Gruszka, D., Veprintsev, D., and Neuhaus, D. (2011). The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger. Journal of molecular biology *407*, 149-170.
Evans, R.M., Barish, G.D., and Wang, Y.-X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. Nature medicine *10*, 355-361.
Fahrer, J., Kranaster, R., Altmeyer, M., Marx, A., and Burkle, A. (2007). Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. Nucleic Acids Res *35*, e143.
Fahrer, J., Popp, O., Malanga, M., Beneke, S., Markovitz, D.M., Ferrando-May, E., Burkle, A., and Kappes, F. (2010). High-affinity interaction of poly(ADP-ribose) and the human DEK oncoprotein depends upon chain length. Biochemistry *49*, 7119-7130.
Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. Nature *434*, 605-611.
Fan, J., Otterlei, M., Wong, H.K., Tomkinson, A.E., and Wilson, D.M. (2004). XRCC1 co-localizes and physically interacts with PCNA. Nucleic Acids Research *32*, 2193-2201.
Fang, W.Q., Ip, J.P., Li, R., Ng, Y.P., Lin, S.C., Chen, Y., Fu, A.K., and Ip, N.Y. (2011). Cdk5-mediated phosphorylation of Axin directs axon formation during cerebral cortex development. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *31*, 13613-13624.
Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C.*, et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. Nature *434*, 917-921.
Farres, J., Llacuna, L., Martin-Caballero, J., Martinez, C., Lozano, J.J., Ampurdanes, C., Lopez-Contreras, A.J., Florensa, L., Navarro, J., Ottina, E.*, et al.* (2015). PARP-2 sustains erythropoiesis in mice by limiting replicative stress in erythroid progenitors. Cell Death Differ *22*, 1144-1157.
Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S., and Pfeiffer, P. (2000). DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. Nucleic Acids Res *28*, 2585-2596.
Feng, L., and Chen, J. (2012). The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair. Nat Struct Mol Biol *19*, 201-206.
Feng, L., Fong, K.W., Wang, J., Wang, W., and Chen, J. (2013). RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. J Biol Chem *288*, 11135-11143.
Feng, L., Li, N., Li, Y., Wang, J., Gao, M., Wang, W., and Chen, J. (2015). Cell cycle-dependent inhibition of 53BP1 signaling by BRCA1. *1*, 15019.
Feng, Y.-Z., Liu, Y.-L., He, X.-F., Wei, W., Shen, X.-L., and Xie, D.-L. (2014). Association between the XRCC1 Arg194Trp polymorphism and risk of cancer: evidence from 201 case–control studies. Tumor Biology *35*, 10677-10697.
Fenton, A.L., Shirodkar, P., Macrae, C.J., Meng, L., and Koch, C.A. (2013). The PARP3- and ATM-dependent phosphorylation of APLF facilitates DNA double-strand break repair. Nucleic Acids Res *41*, 4080-4092.
Ferguson, D.O., Sekiguchi, J.M., Chang, S., Frank, K.M., Gao, Y., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 6630-6633.
Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.-T., Celeste, A., Ward, I., Romanienko, P.J., Morales, J.C., Naka, K., Xia, Z., Camerini-Otero, R.D., Motoyama, N.*, et al.* (2002). DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. Nat Cell Biol *4*, 993-997.
Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P., and Nussenzweig, A. (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. Developmental cell *4*, 497-508.

Ferro, A.M., and Olivera, B.M. (1982). Poly(ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism. Journal of Biological Chemistry *257*, 7808-7813.
Fisher, A.E., Hochegger, H., Takeda, S., and Caldecott, K.W. (2007a). Poly (ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly (ADP-ribose) glycohydrolase. Molecular and cellular biology *27*, 5597-5605.
Flynn, R.L., and Zou, L. (2010). Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology *45*, 266-275.
Fnu, S., Williamson, E.A., De Haro, L.P., Brenneman, M., Wray, J., Shaheen, M., Radhakrishnan, K., Lee, S.H., Nickoloff, J.A., and Hromas, R. (2011). Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 540-545.
Fortini, P., and Dogliotti, E. (2007). Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. DNA Repair (Amst) *6*, 398-409.
Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O.M., Laval, J., and Dogliotti, E. (1999). The Type of DNA Glycosylase Determines the Base Excision Repair Pathway in Mammalian Cells. Journal of Biological Chemistry *274*, 15230-15236.
Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R.W., Wilson, S.H., and Dogliotti, E. (1998). Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. Biochemistry *37*, 3575-3580.
Fouquerel, E., Goellner, E.M., Yu, Z., Gagne, J.P., Barbi de Moura, M., Feinstein, T., Wheeler, D., Redpath, P., Li, J., Romero, G.*, et al.* (2014). ARTD1/PARP1 negatively regulates glycolysis by inhibiting hexokinase 1 independent of NAD+ depletion. Cell Rep *8*, 1819-1831.
Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C., Huang, H., Landry, M.C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F.*, et al.* (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. Nature *499*, 50-54.
Frank-Vaillant, M., and Marcand, S. (2002). Transient stability of DNA ends allows nonhomologous end joining to precede homologous recombination. Mol Cell *10*, 1189-1199.
Frank, K.M., Sharpless, N.E., Gao, Y., Sekiguchi, J.M., Ferguson, D.O., Zhu, C., Manis, J.P., Horner, J., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. Mol Cell *5*, 993-1002.
Friedberg, E.C., Lehmann, A.R., and Fuchs, R.P.P. (2005). Trading Places: How Do DNA Polymerases Switch during Translesion DNA Synthesis? Molecular Cell *18*, 499-505.
Friedman, J.I., Majumdar, A., and Stivers, J.T. (2009). Nontarget DNA binding shapes the dynamic landscape for enzymatic recognition of DNA damage. Nucleic Acids Res *37*, 3493-3500.
Frye, R.A. (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. Biochemical and biophysical research communications *260*, 273-279.
Fujimura, S., Hasegawa, S., Shimizu, Y., and Sugimura, T. (1967). Polymerization of the adenosine 5'-diphosphate-ribose moiety of nicotinamide-adenine dinucleotide by nuclear enzyme. I. Enzymatic reactions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis *145*, 247-259.
Fukuchi, K., Tomoyasu, S., Nakamaki, T., Tsuruoka, N., and Gomi, K. (1998). DNA damage induces p21 protein expression by inhibiting ubiquitination in ML-1 cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1404*, 405-411.
Gagne, J.P., Hunter, J.M., Labrecque, B., Chabot, B., and Poirier, G.G. (2003). A proteomic approach to the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins. The Biochemical journal *371*, 331-340.
Gagne, J.P., Isabelle, M., Lo, K.S., Bourassa, S., Hendzel, M.J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Poirier, G.G. (2008). Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. Nucleic Acids Res *36*, 6959-6976.

Gagne, J.P., Pic, E., Isabelle, M., Krietsch, J., Ethier, C., Paquet, E., Kelly, I., Boutin, M., Moon, K.M., Foster, L.J.*, et al.* (2012). Quantitative proteomics profiling of the poly(ADP-ribose)-related response to genotoxic stress. Nucleic Acids Res *40*, 7788-7805.
Gao, Y., Ferguson, D.O., Xie, W., Manis, J.P., Sekiguchi, J., Frank, K.M., Chaudhuri, J., Horner, J., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. Nature *404*, 897-900.
Gao, Y., Katyal, S., Lee, Y., Zhao, J., Rehg, J.E., Russell, H.R., and McKinnon, P.J. (2011). DNA ligase III is critical for mtDNA integrity but not Xrcc1-mediated nuclear DNA repair. Nature *471*, 240-244.
Garber, J.E., and Offit, K. (2005). Hereditary Cancer Predisposition Syndromes. Journal of Clinical Oncology *23*, 276-292.
Garcia, V., Phelps, S.E., Gray, S., and Neale, M.J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. Nature *479*, 241-244.
Gatti, M., Pinato, S., Maspero, E., Soffientini, P., Polo, S., and Penengo, L. (2012). A novel ubiquitin mark at the N-terminal tail of histone H2As targeted by RNF168 ubiquitin ligase. Cell Cycle *11*, 2538-2544.
Gauci, S., Helbig, A.O., Slijper, M., Krijgsveld, J., Heck, A.J., and Mohammed, S. (2009). Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach. Anal Chem *81*, 4493-4501.
Gelot, C., Guirouilh-Barbat, J., Le Guen, T., Dardillac, E., Chailleux, C., Canitrot, Y., and Lopez, B.S. (2016). The Cohesin Complex Prevents the End Joining of Distant DNA Double-Strand Ends. Mol Cell *61*, 15-26.
Gennari, A., Sormani, M., Varesco, L., Pronzato, P., Viassolo, V., Mirisola, V., Pfeffer, U., and Bruzzi, P. (2009). Prognostic significance of BRCA1, PARP1, and PARP2 in sporadic breast cancer. Journal of Clinical Oncology *27*, e22114-e22114.
Gerton, J.L., and Hawley, R.S. (2005). Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. Nature reviews Genetics *6*, 477-487.
Ghezraoui, H., Piganeau, M., Renouf, B., Renaud, J.B., Sallmyr, A., Ruis, B., Oh, S., Tomkinson, A.E., Hendrickson, E.A., Giovannangeli, C.*, et al.* (2014). Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. Mol Cell *55*, 829-842.
Ghosh, R., Roy, S., Kamyab, J., Dantzer, F., and Franco, S. (2016). Common and unique genetic interactions of the poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 with DNA double-strand break repair pathways. DNA Repair *45*, 56-62.
Gibson, B.A., and Kraus, W.L. (2012a). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. Nat Rev Mol Cell Biol *13*, 411-424.
Gibson, B.A., Zhang, Y., Jiang, H., Hussey, K.M., Shrimp, J.H., Lin, H., Schwede, F., Yu, Y., and Kraus, W.L. (2016). Chemical genetic discovery of PARP targets reveals a role for PARP-1 in transcription elongation. Science *353*, 45-50.
Gill, D.M., Pappenheimer, A.M., Brown, R., and Kurnick, J.T. (1969). STUDIES ON THE MODE OF ACTION OF DIPHTHERIA TOXIN. The Journal of Experimental Medicine *129*, 1.
Gilljam, K.M., Feyzi, E., Aas, P.A., Sousa, M.M., Müller, R., Vågbø, C.B., Catterall, T.C., Liabakk, N.B., Slupphaug, G., and Drabløs, F. (2009). Identification of a novel, widespread, and functionally important PCNA-binding motif. The Journal of cell biology *186*, 645-654.
Godderis, L., Aka, P., Mateuca, R., Kirsch-Volders, M., Lison, D., and Veulemans, H. (2006). Dose-dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation. Toxicology *219*, 220-229.
Godon, C., Cordelieres, F.P., Biard, D., Giocanti, N., Megnin-Chanet, F., Hall, J., and Favaudon, V. (2008). PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. Nucleic acids research *36*, 4454-4464.

Goenka, S., and Boothby, M. (2006). Selective potentiation of Stat-dependent gene expression by collaborator of Stat6 (CoaSt6), a transcriptional cofactor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 4210-4215.
Goff, J.P., Shields, D.S., Seki, M., Choi, S., Epperly, M.W., Dixon, T., Wang, H., Bakkenist, C.J., Dertinger, S.D., Torous, D.K.*, et al.* (2009). Lack of DNA polymerase theta (POLQ) radiosensitizes bone marrow stromal cells in vitro and increases reticulocyte micronuclei after total-body irradiation. Radiat Res *172*, 165-174.
Gomes, X.V., Henricksen, L.A., and Wold, M.S. (1996). Proteolytic mapping of human replication protein A: evidence for multiple structural domains and a conformational change upon interaction with single-stranded DNA. Biochemistry *35*, 5586-5595.
Goodarzi, A.A., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. Mol Cell *31*, 167-177.
Goode, E.L., Ulrich, C.M., and Potter, J.D. (2002). Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention *11*, 1513.
Goodman, M.F. (2002). Error-Prone Repair DNA Polymerases in Prokaryotes and Eukaryotes. Annual Review of Biochemistry *71*, 17-50.
Gottipati, P., Vischioni, B., Schultz, N., Solomons, J., Bryant, H.E., Djureinovic, T., Issaeva, N., Sleeth, K., Sharma, R.A., and Helleday, T. (2010). Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells. Cancer research *70*, 5389-5398.
Göttlich, B., Reichenberger, S., Feldmann, E., and Pfeiffer, P. (1998). Rejoining of DNA double-strand breaks in vitro by single-strand annealing. European Journal of Biochemistry *258*, 387-395.
Gottlieb, T.M., and Jackson, S.P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. Cell *72*, 131-142.
Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J., Barascu, A., Pennarun, G., Genet, D., Rass, E., Germann, S.M., Bertrand, P., Hickson, I.D., and Lopez, B.S. (2013). A role for BLM in double-strand break repair pathway choice: prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. Cell Rep *5*, 21-28.
Graham, T.G., Walter, J.C., and Loparo, J.J. (2016). Two-Stage Synapsis of DNA Ends during Non-homologous End Joining. Mol Cell *61*, 850-858.
Grant, N.J., Coates, P.J., Woods, Y.L., Bray, S.E., Morrice, N.A., Hastie, C.J., Lamont, D.J., Carey, F.A., and Sutherland, C. (2015). Phosphorylation of a splice variant of collapsin response mediator protein 2 in the nucleus of tumour cells links cyclin dependent kinase-5 to oncogenesis. BMC Cancer *15*, 885.
Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., and Jackson, S.P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. Genes Dev *22*, 2767-2772.
Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., and Lieber, M.R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. Nature *388*, 492-495.
Greenberg, R.A., Sobhian, B., Pathania, S., Cantor, S.B., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2006). Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. Genes Dev *20*, 34-46.
Griffin, C.S., Simpson, P.J., Wilson, C.R., and Thacker, J. (2000). Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation. Nat Cell Biol *2*, 757-761.
Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell *97*, 503-514.
Grundy, G.J., Polo, L.M., Zeng, Z., Rulten, S.L., Hoch, N.C., Paomephan, P., Xu, Y., Sweet, S.M., Thorne, A.W., Oliver, A.W.*, et al.* (2016). PARP3 is a sensor of nicked nucleosomes and monoribosylates histone H2BGlu2. Nature Communications *7*, 12404.

Grundy, G.J., Rulten, S.L., Zeng, Z., Arribas-Bosacoma, R., Iles, N., Manley, K., Oliver, A., and Caldecott, K.W. (2013). APLF promotes the assembly and activity of non-homologous end joining protein complexes. Embo j *32*, 112-125.
Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M.F., and Lieber, M.R. (2007). XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. Embo j *26*, 1010-1023.
Gu, Y., Seidl, K.J., Rathbun, G.A., Zhu, C., Manis, J.P., van der Stoep, N., Davidson, L., Cheng, H.L., Sekiguchi, J.M., Frank, K.*, et al.* (1997). Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. Immunity *7*, 653-665.
Guidos, C.J., Williams, C.J., Grandal, I., Knowles, G., Huang, M.T., and Danska, J.S. (1996). V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. Genes Dev *10*, 2038-2054.
Guillon, H., Baudat, F., Grey, C., Liskay, R.M., and de Massy, B. (2005). Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis. Mol Cell *20*, 563-573.
Guirouilh-Barbat, J., Gelot, C., Xie, A., Dardillac, E., Scully, R., and Lopez, B.S. (2016). 53BP1 Protects against CtIP-Dependent Capture of Ectopic Chromosomal Sequences at the Junction of Distant Double-Strand Breaks. PLoS genetics *12*, e1006230.
Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., and Lopez, B.S. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. Mol Cell *14*, 611-623.
Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., and Lopez, B.S. (2008). S-phase progression stimulates both the mutagenic KU-independent pathway and mutagenic processing of KU-dependent intermediates, for nonhomologous end joining. Oncogene *27*, 1726-1736.
Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2007). Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 20902-20907.
Guo, X., Ma, J., Sun, J., and Gao, G. (2007). The zinc-finger antiviral protein recruits the RNA processing exosome to degrade the target mRNA. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 151-156.
Gupta, S., and Meek, K. (2005). The leucine rich region of DNA-PKcs contributes to its innate DNA affinity. Nucleic Acids Res *33*, 6972-6981.
Gupte, R., Liu, Z., and Kraus, W.L. (2017). PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. Genes Dev *31*, 101-126.
Guzzo, C.M., Berndsen, C.E., Zhu, J., Gupta, V., Datta, A., Greenberg, R.A., Wolberger, C., and Matunis, M.J. (2012). RNF4-dependent hybrid SUMO-ubiquitin chains are signals for RAP80 and thereby mediate the recruitment of BRCA1 to sites of DNA damage. Science signaling *5*, ra88.
Ha, K., Fiskus, W., Choi, D.S., Bhaskara, S., Cerchietti, L., Devaraj, S.G., Shah, B., Sharma, S., Chang, J.C., Melnick, A.M.*, et al.* (2014). Histone deacetylase inhibitor treatment induces 'BRCAness' and synergistic lethality with PARP inhibitor and cisplatin against human triple negative breast cancer cells. Oncotarget *5*, 5637-5650.
Haber, J.E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *191*, 33-64.
Haenni, S.S., Hassa, P.O., Altmeyer, M., Fey, M., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2008). Identification of lysines 36 and 37 of PARP-2 as targets for acetylation and auto-ADP-ribosylation. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology *40*, 2274-2283.
Haigis, M.C., Mostoslavsky, R., Haigis, K.M., Fahie, K., Christodoulou, D.C., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Karow, M., Blander, G.*, et al.* (2006). SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. Cell *126*, 941-954.
Haikarainen, T., Narwal, M., Joensuu, P., and Lehtio, L. (2014). Evaluation and Structural Basis for the Inhibition of Tankyrases by PARP Inhibitors. ACS medicinal chemistry letters *5*, 18-22.

Haince, J.-F., McDonald, D., Rodrigue, A., Déry, U., Masson, J.-Y., Hendzel, M.J., and Poirier, G.G. (2008). PARP1-dependent Kinetics of Recruitment of MRE11 and NBS1 Proteins to Multiple DNA Damage Sites. Journal of Biological Chemistry *283*, 1197-1208.
Hall, T.M. (2005). Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. Current opinion in structural biology *15*, 367-373.
Hammarsten, O., and Chu, G. (1998). DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 525-530.
Hammel, M., Yu, Y., Fang, S., Lees-Miller, S.P., and Tainer, J.A. (2010a). XLF regulates filament architecture of the XRCC4.ligase IV complex. Structure (London, England : 1993) *18*, 1431-1442.
Hammel, M., Yu, Y., Mahaney, B.L., Cai, B., Ye, R., Phipps, B.M., Rambo, R.P., Hura, G.L., Pelikan, M., So, S.*, et al.* (2010b). Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex. J Biol Chem *285*, 1414-1423.
Hanaoka, S., Nagadoi, A., and Nishimura, Y. (2005). Comparison between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities. Protein Science *14*, 119-130.
Hanssen-Bauer, A., Solvang-Garten, K., Sundheim, O., Peña-Diaz, J., Andersen, S., Slupphaug, G., Krokan, H.E., Wilson, D.M., Akbari, M., and Otterlei, M. (2011). XRCC1 coordinates disparate responses and multiprotein repair complexes depending on the nature and context of the DNA damage. Environmental and Molecular Mutagenesis *52*, 623-635.
Hanzlikova, H., Gittens, W., Krejcikova, K., Zeng, Z., and Caldecott, K.W. (2017). Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin. Nucleic Acids Research *45*, 2546-2557.
Hao, B., Miao, X., Li, Y., Zhang, X., Sun, T., Liang, G., Zhao, Y., Zhou, Y., Wang, H., Chen, X.*, et al.* (2006). A novel T-77C polymorphism in DNA repair gene XRCC1 contributes to diminished promoter activity and increased risk of non-small cell lung cancer. Oncogene *25*, 3613-3620.
Hao, B., Wang, H., Zhou, K., Li, Y., Chen, X., Zhou, G., Zhu, Y., Miao, X., Tan, W., Wei, Q.*, et al.* (2004). Identification of genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma. Cancer research *64*, 4378-4384.
Hashimoto, Y., Puddu, F., and Costanzo, V. (2012). RAD51- and MRE11-dependent reassembly of uncoupled CMG helicase complex at collapsed replication forks. Nat Struct Mol Biol *19*, 17-24.
Hashimoto, Y., Ray Chaudhuri, A., Lopes, M., and Costanzo, V. (2010). Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. Nat Struct Mol Biol *17*, 1305-1311.
Hassler, M., Jankevicius, G., and Ladurner, A.G. (2011). PARG: a macrodomain in disguise. Structure (London, England : 1993) *19*, 1351-1353.
Heacock, M., Spangler, E., Riha, K., Puizina, J., and Shippen, D.E. (2004). Molecular analysis of telomere fusions in Arabidopsis: multiple pathways for chromosome end-joining. Embo j *23*, 2304-2313.
Hegde, M.L., Hazra, T.K., and Mitra, S. (2008a). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. Cell research *18*, 27-47.
Hegde, M.L., Theriot, C.A., Das, A., Hegde, P.M., Guo, Z., Gary, R.K., Hazra, T.K., Shen, B., and Mitra, S. (2008b). Physical and Functional Interaction between Human Oxidized Base-specific DNA Glycosylase NEIL1 and Flap Endonuclease 1. Journal of Biological Chemistry *283*, 27028-27037.
Helleday, T., Eshtad, S., and Nik-Zainal, S. (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. Nature reviews Genetics *15*, 585-598.
Henneman, L., van Miltenburg, M.H., Michalak, E.M., Braumuller, T.M., Jaspers, J.E., Drenth, A.P., de Korte-Grimmerink, R., Gogola, E., Szuhai, K., Schlicker, A.*, et al.* (2015). Selective resistance to the PARP inhibitor olaparib in a mouse model for BRCA1-deficient metaplastic breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A *112*, 8409-8414.

Henrie, M.S., Kurimasa, A., Burma, S., Ménissier-de Murcia, J., de Murcia, G., Li, G.C., and Chen, D.J. (2003). Lethality in PARP-1/Ku80 double mutant mice reveals physiological synergy during early embryogenesis. DNA Repair *2*, 151-158.
Herzog, J., Ehrlich, S.M., Pfitzer, L., Liebl, J., Frohlich, T., Arnold, G.J., Mikulits, W., Haider, C., Vollmar, A.M., and Zahler, S. (2016). Cyclin-dependent kinase 5 stabilizes hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel approach for inhibiting angiogenesis in hepatocellular carcinoma. Oncotarget *7*, 27108-27121.
Hicks, W.M., Yamaguchi, M., and Haber, J.E. (2011). Real-time analysis of double-strand DNA break repair by homologous recombination. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 3108-3115.
Hochegger, H., Dejsuphong, D., Fukushima, T., Morrison, C., Sonoda, E., Schreiber, V., Zhao, G.Y., Saberi, A., Masutani, M., Adachi, N.*, et al.* (2006). Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. The EMBO Journal *25*, 1305.
Honjo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O., and Kato, I. (1968). Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. Journal of Biological Chemistry *243*, 3553-3555.
Hopfner, K.P., Karcher, A., Craig, L., Woo, T.T., Carney, J.P., and Tainer, J.A. (2001). Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. Cell *105*, 473-485.
Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D., Fairley, C., Tainer, J.A., and Carney, J.P. (2000). Mre11 and Rad50 from Pyrococcus furiosus: cloning and biochemical characterization reveal an evolutionarily conserved multiprotein machine. Journal of bacteriology *182*, 6036-6041.
Horton, J.K., Watson, M., Stefanick, D.F., Shaughnessy, D.T., Taylor, J.A., and Wilson, S.H. (2008). XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. Cell research *18*, 48-63.
Howard, S.M., Yanez, D.A., and Stark, J.M. (2015). DNA Damage Response Factors from Diverse Pathways, Including DNA Crosslink Repair, Mediate Alternative End Joining. PLoS genetics *11*, e1004943.
Hsu, H.L., Yannone, S.M., and Chen, D.J. (2002). Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. DNA Repair (Amst) *1*, 225-235.
Hu, X., Paul, A., and Wang, B. (2012). Rap80 protein recruitment to DNA double-strand breaks requires binding to both small ubiquitin-like modifier (SUMO) and ubiquitin conjugates. J Biol Chem *287*, 25510-25519.
Hu, Y., Wang, C., Huang, K., Xia, F., Parvin, J.D., and Mondal, N. (2014). Regulation of 53BP1 Protein Stability by RNF8 and RNF168 Is Important for Efficient DNA Double-Strand Break Repair. PloS one *9*, e110522.
Huang, E., Qu, D., Zhang, Y., Venderova, K., Haque, M.E., Rousseaux, M.W., Slack, R.S., Woulfe, J.M., and Park, D.S. (2010). The role of Cdk5-mediated apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 phosphorylation in neuronal death. Nat Cell Biol *12*, 563-571.
Huang, S.-M.A., Mishina, Y.M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G.A., Charlat, O., Wiellette, E., Zhang, Y., Wiessner, S.*, et al.* (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. Nature *461*, 614-620.
Huber, A., Bai, P., de Murcia, J.M., and de Murcia, G. (2004). PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. DNA Repair (Amst) *3*, 1103-1108.
Huen, M.S., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M.B., and Chen, J. (2007). RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. Cell *131*, 901-914.
Huertas, P., and Aguilera, A. (2003). Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. Mol Cell *12*, 711-721.
Huertas, P., and Jackson, S.P. (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. J Biol Chem *284*, 9558-9565.

Huletsky, A., de Murcia, G., Muller, S., Hengartner, M., Menard, L., Lamarre, D., and Poirier, G.G. (1989). The effect of poly(ADP-ribosyl)ation on native and H1-depleted chromatin. A role of poly(ADP-ribosyl)ation on core nucleosome structure. J Biol Chem *264*, 8878-8886.
Hung, R.J., Hall, J., Brennan, P., and Boffetta, P. (2005). Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. American journal of epidemiology *162*, 925-942.
Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. Embo j *29*, 1446-1457.
Iles, N., Rulten, S., El-Khamisy, S.F., and Caldecott, K.W. (2007). APLF (C2orf13) Is a Novel Human Protein Involved in the Cellular Response to Chromosomal DNA Strand Breaks. Molecular and Cellular Biology *27*, 3793-3803.
Imai, S.-i., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. Nature *403*, 795-800.
Interthal, H., Chen, H.J., and Champoux, J.J. (2005a). Human Tdp1 cleaves a broad spectrum of substrates, including phosphoamide linkages. The Journal of biological chemistry *280*, 36518-36528.
Interthal, H., Chen, H.J., Kehl-Fie, T.E., Zotzmann, J., Leppard, J.B., and Champoux, J.J. (2005b). SCAN1 mutant Tdp1 accumulates the enzyme–DNA intermediate and causes camptothecin hypersensitivity. The EMBO Journal *24*, 2224.
Isabelle, M., Gagne, J.P., Gallouzi, I.E., and Poirier, G.G. (2012). Quantitative proteomics and dynamic imaging reveal that G3BP-mediated stress granule assembly is poly(ADP-ribose)-dependent following exposure to MNNG-induced DNA alkylation. Journal of cell science *125*, 4555-4566.
Isabelle, M., Moreel, X., Gagne, J.P., Rouleau, M., Ethier, C., Gagne, P., Hendzel, M.J., and Poirier, G.G. (2010). Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry. Proteome Sci *8*, 22.
Ismail, I.H., Gagne, J.P., Caron, M.C., McDonald, D., Xu, Z., Masson, J.Y., Poirier, G.G., and Hendzel, M.J. (2012). CBX4-mediated SUMO modification regulates BMI1 recruitment at sites of DNA damage. Nucleic Acids Res *40*, 5497-5510.
Isogai, S., Kanno, S., Ariyoshi, M., Tochio, H., Ito, Y., Yasui, A., and Shirakawa, M. (2010). Solution structure of a zinc-finger domain that binds to poly-ADP-ribose. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms *15*, 101-110.
Isono, M., Niimi, A., Oike, T., Hagiwara, Y., Sato, H., Sekine, R., Yoshida, Y., Isobe, S.Y., Obuse, C., Nishi, R.*, et al.* (2017). BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. Cell Rep *18*, 520-532.
Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., and Haber, J.E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *142*, 693-704.
Iwabuchi, K., Hashimoto, M., Matsui, T., Kurihara, T., Shimizu, H., Adachi, N., Ishiai, M., Yamamoto, K., Tauchi, H., Takata, M.*, et al.* (2006). 53BP1 contributes to survival of cells irradiated with X-ray during G1 without Ku70 or Artemis. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms *11*, 935-948.
Izhar, L., Adamson, B., Ciccia, A., Lewis, J., Pontano-Vaites, L., Leng, Y., Liang, A.C., Westbrook, T.F., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2015). A Systematic Analysis of Factors Localized to Damaged Chromatin Reveals PARP-Dependent Recruitment of Transcription Factors. Cell Rep *11*, 1486-1500.
Izumi, T., Wiederhold, L.R., Roy, G., Roy, R., Jaiswal, A., Bhakat, K.K., Mitra, S., and Hazra, T.K. (2003). Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. Toxicology *193*, 43-65.
Jacobs, A.L., and Schär, P. (2012). DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. Chromosoma *121*, 1-20.

Jacobson, M.K., Payne, D.M., Alvarez-Gonzalez, R., Juarez-Salinas, H., Sims, J.L., and Jacobson, E.L. (1984). [50] Determination of in Vivo levels of polymeric and monomeric ADP-ribose by fluorescence methods. Methods in enzymology *106*, 483-494.
James, M.R., and Lehmann, A.R. (1982). Role of poly (adenosine diphosphate ribose) in deoxyribonucleic acid repair in human fibroblasts. Biochemistry *21*, 4007-4013.
Jankevicius, G., Hassler, M., Golia, B., Rybin, V., Zacharias, M., Timinszky, G., and Ladurner, A.G. (2013). A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation. Nat Struct Mol Biol *20*, 508-514.
Jasek, E., Gajda, M., Lis, G.J., Jasinska, M., and Litwin, J.A. (2014). Combinatorial effects of PARP inhibitor PJ34 and histone deacetylase inhibitor vorinostat on leukemia cell lines. Anticancer research *34*, 1849-1856.
Jaspers, J.E., Kersbergen, A., Boon, U., Sol, W., van Deemter, L., Zander, S.A., Drost, R., Wientjens, E., Ji, J., Aly, A.*, et al.* (2013). Loss of 53BP1 Causes PARP Inhibitor Resistance in Brca1-Mutated Mouse Mammary Tumors. Cancer Discovery *3*, 68.
Jiang, G., Plo, I., Wang, T., Rahman, M., Cho, J.H., Yang, E., Lopez, B.S., and Xia, F. (2013). BRCA1-Ku80 protein interaction enhances end-joining fidelity of chromosomal double-strand breaks in the G1 phase of the cell cycle. J Biol Chem *288*, 8966-8976.
Jiang, Q., and Greenberg, R.A. (2015). Deciphering the BRCA1 Tumor Suppressor Network. Journal of Biological Chemistry *290*, 17724-17732.
Jilani, A., Ramotar, D., Slack, C., Ong, C., Yang, X.M., Scherer, S.W., and Lasko, D.D. (1999). Molecular Cloning of the Human Gene, PNKP, Encoding a Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase and Evidence for Its Role in Repair of DNA Strand Breaks Caused by Oxidative Damage. Journal of Biological Chemistry *274*, 24176-24186.
Johansson, M. (1999). A human poly (ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly (ADP-ribose) polymerase homologues. Genomics *57*, 442-445.
Johnson, N., Johnson, S.F., Yao, W., Li, Y.C., Choi, Y.E., Bernhardy, A.J., Wang, Y., Capelletti, M., Sarosiek, K.A., Moreau, L.A.*, et al.* (2013). Stabilization of mutant BRCA1 protein confers PARP inhibitor and platinum resistance. Proc Natl Acad Sci U S A *110*, 17041-17046.
Joo, W.S., Jeffrey, P.D., Cantor, S.B., Finnin, M.S., Livingston, D.M., and Pavletich, N.P. (2002). Structure of the 53BP1 BRCT region bound to p53 and its comparison to the Brca1 BRCT structure. Genes & Development *16*, 583-593.
Jowsey, P.A., Doherty, A.J., and Rouse, J. (2004). Human PTIP facilitates ATM-mediated activation of p53 and promotes cellular resistance to ionizing radiation. J Biol Chem *279*, 55562-55569.
Jungmichel, S., Rosenthal, F., Altmeyer, M., Lukas, J., Hottiger, M.O., and Nielsen, M.L. (2013a). Proteome-wide identification of poly (ADP-Ribosyl) ation targets in different genotoxic stress responses. Molecular cell *52*, 272-285.
Jwa, M., and Chang, P. (2012). PARP16 is a tail-anchored endoplasmic reticulum protein required for the PERK- and IRE1alpha-mediated unfolded protein response. Nat Cell Biol *14*, 1223-1230.
Kachhap, S.K., Rosmus, N., Collis, S.J., Kortenhorst, M.S., Wissing, M.D., Hedayati, M., Shabbeer, S., Mendonca, J., Deangelis, J., Marchionni, L.*, et al.* (2010). Downregulation of homologous recombination DNA repair genes by HDAC inhibition in prostate cancer is mediated through the E2F1 transcription factor. PloS one *5*, e11208.
Kais, Z., Rondinelli, B., Holmes, A., O'Leary, C., Kozono, D., D'Andrea, Alan D., and Ceccaldi, R. (2016). FANCD2 Maintains Fork Stability in BRCA1/2-Deficient Tumors and Promotes Alternative End-Joining DNA Repair. Cell Reports *15*, 2488-2499.
Kalb, R., Mallery, D.L., Larkin, C., Huang, J.T., and Hiom, K. (2014). BRCA1 is a histone-H2A-specific ubiquitin ligase. Cell Rep *8*, 999-1005.

Kalisch, T., Ame, J.C., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2012). New readers and interpretations of poly(ADP-ribosyl)ation. Trends in biochemical sciences *37*, 381-390.
Kaminker, P.G., Kim, S.H., Taylor, R.D., Zebarjadian, Y., Funk, W.D., Morin, G.B., Yaswen, P., and Campisi, J. (2001). TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. J Biol Chem *276*, 35891-35899.
Kang, H.C., Lee, Y.I., Shin, J.H., Andrabi, S.A., Chi, Z., Gagne, J.P., Lee, Y., Ko, H.S., Lee, B.D., Poirier, G.G.*, et al.* (2011). Iduna is a poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent E3 ubiquitin ligase that regulates DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 14103-14108.
Kang, Y.H., Lee, K.A., Kim, J.H., Park, S.G., and Yoon, D.Y. (2010). Mitomycin C modulates DNA-double strand break repair genes in cervical carcinoma cells. Amino acids *39*, 1291-1298.
Karanjawala, Z.E., Grawunder, U., Hsieh, C.L., and Lieber, M.R. (1999). The nonhomologous DNA end joining pathway is important for chromosome stability in primary fibroblasts. Current biology : CB *9*, 1501-1504.
Karicheva, O., Rodriguez-Vargas, J.M., Wadier, N., Martin-Hernandez, K., Vauchelles, R., Magroun, N., Tissier, A., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2016). PARP3 controls TGFβ and ROS driven epithelial-to-mesenchymal transition and stemness by stimulating a TG2-Snail-E-cadherin axis. Oncotarget *7*, 64109-64123.
Karlberg, T., Klepsch, M., Thorsell, A.G., Andersson, C.D., Linusson, A., and Schuler, H. (2015). Structural basis for lack of ADP-ribosyltransferase activity in poly(ADP-ribose) polymerase-13/zinc finger antiviral protein. J Biol Chem *290*, 7336-7344.
Karner, C.M., Merkel, C.E., Dodge, M., Ma, Z., Lu, J., Chen, C., Lum, L., and Carroll, T.J. (2010). Tankyrase is necessary for canonical Wnt signaling during kidney development. Developmental Dynamics *239*, 2014-2023.
Karras, G.I., Kustatscher, G., Buhecha, H.R., Allen, M.D., Pugieux, C., Sait, F., Bycroft, M., and Ladurner, A.G. (2005). The macro domain is an ADP-ribose binding module. Embo j *24*, 1911-1920.
Kaufman, B., Shapira-Frommer, R., Schmutzler, R.K., Audeh, M.W., Friedlander, M., Balmaña, J., Mitchell, G., Fried, G., Stemmer, S.M., Hubert, A.*, et al.* (2015). Olaparib Monotherapy in Patients With Advanced Cancer and a Germline BRCA1/2 Mutation. Journal of Clinical Oncology *33*, 244-250.
Kavanaugh, G., Ye, F., Mohni, K.N., Luzwick, J.W., Glick, G., and Cortez, D. (2015). A whole genome RNAi screen identifies replication stress response genes. DNA Repair (Amst) *35*, 55-62.
Kawamura, K., Bahar, R., Seimiya, M., Chiyo, M., Wada, A., Okada, S., Hatano, M., Tokuhisa, T., Kimura, H., Watanabe, S.*, et al.* (2004). DNA polymerase theta is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. International journal of cancer *109*, 9-16.
Kawasaki, T., Yokoi, S., Tsuda, H., Izumi, H., Kozaki, K., Aida, S., Ozeki, Y., Yoshizawa, Y., Imoto, I., and Inazawa, J. (2007). BCL2L2 is a probable target for novel 14q11.2 amplification detected in a non-small cell lung cancer cell line. Cancer science *98*, 1070-1077.
Ke, Y., Han, Y., Guo, X., Wen, J., Wang, K., Jiang, X., Tian, X., Ba, X., Boldogh, I., and Zeng, X. (2017). PARP1 promotes gene expression at the post-transcriptional level by modulating the RNA-binding protein HuR. *8*, 14632.
Kelly, R.J., Robey, R.W., Chen, C.C., Draper, D., Luchenko, V., Barnett, D., Oldham, R.K., Caluag, Z., Frye, A.R., Steinberg, S.M.*, et al.* (2012). A pharmacodynamic study of the P-glycoprotein antagonist CBT-1(R) in combination with paclitaxel in solid tumors. Oncologist *17*, 512.
Kent, T., Chandramouly, G., McDevitt, S.M., Ozdemir, A.Y., and Pomerantz, R.T. (2015). Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase θ. Nat Struct Mol Biol *22*, 230-237.
Khodyreva, S.N., Prasad, R., Ilina, E.S., Sukhanova, M.V., Kutuzov, M.M., Liu, Y., Hou, E.W., Wilson, S.H., and Lavrik, O.I. (2010). Apurinic/apyrimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-

ribose) polymerase-1 (PARP-1). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 22090-22095.
Khoury-Haddad, H., Guttmann-Raviv, N., Ipenberg, I., Huggins, D., Jeyasekharan, A.D., and Ayoub, N. (2014). PARP1-dependent recruitment of KDM4D histone demethylase to DNA damage sites promotes double-strand break repair. Proceedings of the National Academy of Sciences *111*, E728-E737.
Kickhoefer, V.A., Siva, A.C., Kedersha, N.L., Inman, E.M., Ruland, C., Streuli, M., and Rome, L.H. (1999a). The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly (ADP-ribose) polymerase. The Journal of cell biology *146*, 917-928.
Kiehlbauch, C., Aboulela, N., Jacobson, E., Ringer, D., and Jacobson, M. (1993). High resolution fractionation and characterization of ADP-ribose polymers. Analytical biochemistry *208*, 26-34.
Kim, G., Ison, G., McKee, A.E., Zhang, H., Tang, S., Gwise, T., Sridhara, R., Lee, E., Tzou, A., Philip, R.*, et al.* (2015). FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *21*, 4257-4261.
Kim, J.S., Krasieva, T.B., Kurumizaka, H., Chen, D.J., Taylor, A.M., and Yokomori, K. (2005). Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. J Cell Biol *170*, 341-347.
Kim, M.Y., Mauro, S., Gévry, N., Lis, J.T., and Kraus, W.L. (2004). NAD+-Dependent Modulation of Chromatin Structure and Transcription by Nucleosome Binding Properties of PARP-1. Cell *119*, 803-814.
Kleine, H., Poreba, E., Lesniewicz, K., Hassa, P.O., Hottiger, M.O., Litchfield, D.W., Shilton, B.H., and Lüscher, B. (2008). Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. Molecular cell *32*, 57-69.
Kleppa, L., Mari, P.O., Larsen, E., Lien, G.F., Godon, C., Theil, A.F., Nesse, G.J., Wiksen, H., Vermeulen, W., Giglia-Mari, G.*, et al.* (2012). Kinetics of endogenous mouse FEN1 in base excision repair. Nucleic Acids Res *40*, 9044-9059.
Klungland, A., and Lindahl, T. (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). Embo j *16*, 3341-3348.
Knezevic, C.E., Wright, G., Remsing Rix, L.L., Kim, W., Kuenzi, B.M., Luo, Y., Watters, J.M., Koomen, J.M., Haura, E.B., Monteiro, A.N.*, et al.* (2016). Proteome-wide Profiling of Clinical PARP Inhibitors Reveals Compound-Specific Secondary Targets. Cell Chemical Biology *23*, 1490-1503.
Koch, C.A., Agyei, R., Galicia, S., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Starostine, A., Weinfeld, M., and Durocher, D. (2004). Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. Embo j *23*, 3874-3885.
Koh, D.W., Lawler, A.M., Poitras, M.F., Sasaki, M., Wattler, S., Nehls, M.C., Stöger, T., Poirier, G.G., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2004). Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 17699-17704.
Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T.M.*, et al.* (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. Science *318*, 1637-1640.
Kosova, A.A., Khodyreva, S.N., and Lavrik, O.I. (2016). Ku antigen displays the AP lyase activity on a certain type of duplex DNA. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics *1864*, 1244-1252.
Kousholt, A.N., Fugger, K., Hoffmann, S., Larsen, B.D., Menzel, T., Sartori, A.A., and Sørensen, C.S. (2012). CtIP-dependent DNA resection is required for DNA damage checkpoint maintenance but not initiation. The Journal of Cell Biology *197*, 869.
Krasikova, Y.S., Rechkunova, N.I., and Lavrik, O.I. (2016). [Replication protein A as a major eukaryotic single-stranded DNA-binding protein and its role in DNA repair]. Molekuliarnaia biologiia *50*, 735-750.

Kraus, W.L., and Hottiger, M.O. (2013). PARP-1 and gene regulation: Progress and puzzles. Molecular aspects of medicine *34*, 1109-1123.
Krawczyk, P.M., Eppink, B., Essers, J., Stap, J., Rodermond, H., Odijk, H., Zelensky, A., van Bree, C., Stalpers, L.J., Buist, M.R.*, et al.* (2011). Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 9851-9856.
Krietsch, J., Caron, M.C., Gagne, J.P., Ethier, C., Vignard, J., Vincent, M., Rouleau, M., Hendzel, M.J., Poirier, G.G., and Masson, J.Y. (2012). PARP activation regulates the RNA-binding protein NONO in the DNA damage response to DNA double-strand breaks. Nucleic Acids Res *40*, 10287-10301.
Krietsch, J., Rouleau, M., Pic, E., Ethier, C., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Masson, J.Y., Poirier, G.G., and Gagne, J.P. (2013). Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins. Molecular aspects of medicine *34*, 1066-1087.
Krishnakumar, R., Gamble, M.J., Frizzell, K.M., Berrocal, J.G., Kininis, M., and Kraus, W.L. (2008). Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. Science *319*, 819-821.
Krokan, H.E., and Bjoras, M. (2013). Base excision repair. Cold Spring Harbor perspectives in biology *5*, a012583.
Krueger, K.M., and Barbieri, J.T. (1995). The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. Clinical microbiology reviews *8*, 34-47.
Kubota, Y., and Horiuchi, S. (2003). Independent roles of XRCC1's two BRCT motifs in recovery from methylation damage. DNA Repair (Amst) *2*, 407-415.
Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schär, P., Barnes, D., and Lindahl, T. (1996a). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. The EMBO journal *15*, 6662.
Kubota, Y., Takanami, T., Higashitani, A., and Horiuchi, S. (2009). Localization of X-ray cross complementing gene 1 protein in the nuclear matrix is controlled by casein kinase II-dependent phosphorylation in response to oxidative damage. DNA Repair *8*, 953-960.
Kupis, W., Pałyga, J., Tomal, E., and Niewiadomska, E. (2016). The role of sirtuins in cellular homeostasis. Journal of Physiology and Biochemistry *72*, 371-380.
Kusumoto, R., Dawut, L., Marchetti, C., Wan Lee, J., Vindigni, A., Ramsden, D., and Bohr, V.A. (2008). Werner protein cooperates with the XRCC4-DNA ligase IV complex in end-processing. Biochemistry *47*, 7548-7556.
Kutuzov, M.M., Khodyreva, S.N., Amé, J.-C., Ilina, E.S., Sukhanova, M.V., Schreiber, V., and Lavrik, O.I. (2013a). Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. Biochimie *95*, 1208-1215.
Ladiges, W., Wiley, J., and MacAuley, A. (2003). Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and age-related disease. Mechanisms of Ageing and Development *124*, 27-32.
Ladiges, W.C. (2006). Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. Oncogene *25*, 1612-1619.
Lahkim Bennani-Belhaj, K., Rouzeau, S., Buhagiar-Labarchede, G., Chabosseau, P., Onclercq-Delic, R., Bayart, E., Cordelieres, F., Couturier, J., and Amor-Gueret, M. (2010). The Bloom syndrome protein limits the lethality associated with RAD51 deficiency. Molecular cancer research : MCR *8*, 385-394.
Lam, I., and Keeney, S. (2014). Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. Cold Spring Harbor perspectives in biology *7*, a016634.
Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., Wilson, S.H., and Yasui, A. (2004). In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 13738-13743.

Langelier, M.-F., and Pascal, J.M. (2013). PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. Current opinion in structural biology *23*, 134-143.
Langelier, M.-F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. (2011). Crystal structures of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. Journal of Biological Chemistry *286*, 10690-10701.
Langelier, M.-F., Riccio, A.A., and Pascal, J.M. (2014a). PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. Nucleic Acids Research *42*, 7762-7775.
Langelier, M.-F., Ruhl, D.D., Planck, J.L., Kraus, W.L., and Pascal, J.M. (2010). The Zn3 domain of human poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly (ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. Journal of biological chemistry *285*, 18877-18887.
Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. (2012). Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. Science *336*, 728-732.
Lavrik, O.I., Prasad, R., Sobol, R.W., Horton, J.K., Ackerman, E.J., and Wilson, S.H. (2001). Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base excision repair intermediate. Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair. The Journal of biological chemistry *276*, 25541-25548.
Lawlor, D., Martin, P., Busschots, S., Thery, J., O'Leary, J.J., Hennessy, B.T., and Stordal, B. (2014). PARP Inhibitors as P-glyoprotein Substrates. Journal of pharmaceutical sciences *103*, 1913-1920.
Le Page, F., Schreiber, V., Dhérin, C., De Murcia, G., and Boiteux, S. (2003). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is required in murine cell lines for base excision repair of oxidative DNA damage in the absence of DNA polymerase β. Journal of Biological Chemistry *278*, 18471-18477.
Lebedeva, N.A., Rechkunova, N.I., and Lavrik, O.I. (2011). AP-site cleavage activity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. FEBS letters *585*, 683-686.
Lee-Theilen, M., Matthews, A.J., Kelly, D., Zheng, S., and Chaudhuri, J. (2011). CtIP promotes microhomology-mediated alternative end joining during class-switch recombination. Nat Struct Mol Biol *18*, 75-79.
Lee, D.-H., Acharya, Sanket S., Kwon, M., Drane, P., Guan, Y., Adelmant, G., Kalev, P., Shah, J., Pellman, D., Marto, Jarrod A.*, et al.* (2014). Dephosphorylation Enables the Recruitment of 53BP1 to Double-Strand DNA Breaks. Molecular Cell *54*, 512-525.
Lee, J.H., Goodarzi, A.A., Jeggo, P.A., and Paull, T.T. (2010). 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. Embo j *29*, 574-585.
Léger, K., Bär, D., Savić, N., Santoro, R., and Hottiger, M.O. (2014). ARTD2 activity is stimulated by RNA. Nucleic acids research *42*, 5072-5082.
Lehmann, A., and Broughton, B. (1984). Poly (ADP-ribosylation) reduces the steady-state level of breaks in DNA following treatment of human cells with alkylating agents. Carcinogenesis *5*, 117-119.
Lehrman, M.A., Schneider, W.J., Sudhof, T.C., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Russell, D.W. (1985). Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. Science *227*, 140-146.
Leidecker, O., Bonfiglio, J.J., Colby, T., Zhang, Q., Atanassov, I., Zaja, R., Palazzo, L., Stockum, A., Ahel, I., and Matic, I. (2016). Serine is a new target residue for endogenous ADP-ribosylation on histones. Nat Chem Biol *12*, 998-1000.
Lemee, F., Bergoglio, V., Fernandez-Vidal, A., Machado-Silva, A., Pillaire, M.J., Bieth, A., Gentil, C., Baker, L., Martin, A.L., Leduc, C.*, et al.* (2010). DNA polymerase theta up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 13390-13395.
Lengsfeld, B.M., Rattray, A.J., Bhaskara, V., Ghirlando, R., and Paull, T.T. (2007). Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. Mol Cell *28*, 638-651.

Leung, A.K., Vyas, S., Rood, J.E., Bhutkar, A., Sharp, P.A., and Chang, P. (2011). Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. Mol Cell *42*, 489-499.
Leung, C.C.Y., and Glover, J.N.M. (2011). BRCT domains. Cell Cycle *10*, 2461-2470.
Levy, N., Martz, A., Bresson, A., Spenlehauer, C., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J. (2006). XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage. Nucleic Acids Res *34*, 32-41.
Li, G.Y., McCulloch, R.D., Fenton, A.L., Cheung, M., Meng, L., Ikura, M., and Koch, C.A. (2010). Structure and identification of ADP-ribose recognition motifs of APLF and role in the DNA damage response. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 9129-9134.
Li, H., Ha, T.C., and Tai, B.C. (2009). XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk in different populations: A meta-analysis. The Breast *18*, 183-191.
Li, H., Li, Q., Li, W., Xie, L., Zhou, M., and Xie, J. (2015). The Role of PARP-1 in Host-Pathogen Interaction and Cellular Stress Responses. Critical reviews in eukaryotic gene expression *25*, 175-190.
Li, M., Lu, L.Y., Yang, C.Y., Wang, S., and Yu, X. (2013). The FHA and BRCT domains recognize ADP-ribosylation during DNA damage response. Genes Dev *27*, 1752-1768.
Li, M., and Yu, X. (2013). Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation. Cancer cell *23*, 693-704.
Li, S., Kanno, S., Watanabe, R., Ogiwara, H., Kohno, T., Watanabe, G., Yasui, A., and Lieber, M.R. (2011a). Polynucleotide kinase and aprataxin-like forkhead-associated protein (PALF) acts as both a single-stranded DNA endonuclease and a single-stranded DNA 3' exonuclease and can participate in DNA end joining in a biochemical system. J Biol Chem *286*, 36368-36377.
Li, Y., Gao, X., and Wang, J.Y. (2011b). Comparison of two POLQ mutants reveals that a polymerase-inactive POLQ retains significant function in tolerance to etoposide and gamma-irradiation in mouse B cells. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms *16*, 973-983.
Liang, F., and Jasin, M. (1996). Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. J Biol Chem *271*, 14405-14411.
Liang, L., Deng, L., Chen, Y., Li, G.C., Shao, C., and Tischfield, J.A. (2005). Modulation of DNA End Joining by Nuclear Proteins. Journal of Biological Chemistry *280*, 31442-31449.
Liang, L., Deng, L., Nguyen, S.C., Zhao, X., Maulion, C.D., Shao, C., and Tischfield, J.A. (2008). Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. Nucleic Acids Res *36*, 3297-3310.
Liang, Y.-C., Hsu, C.-Y., Yao, Y.-L., and Yang, W.-M. (2013). PARP-2 regulates cell cycle-related genes through histone deacetylation and methylation independently of poly(ADP-ribosyl)ation. Biochemical and biophysical research communications *431*, 58-64.
Liebl, J. (2015). Cdk5 and Foxc2--a new relationship in the lymphatic vasculature. Oncotarget *6*, 21799-21801.
Lim, H.S., Kim, J.S., Park, Y.B., Gwon, G.H., and Cho, Y. (2011). Crystal structure of the Mre11-Rad50-ATPgammaS complex: understanding the interplay between Mre11 and Rad50. Genes Dev *25*, 1091-1104.
Lin, F.L., Sperle, K., and Sternberg, N. (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. Molecular and Cellular Biology *4*, 1020-1034.
Lin, L., Zhang, Y.-d., Chen, Z.-y., Chen, Y., and Ren, C.-p. (2016). The clinicopathological significance of miR-149 and PARP-2 in hepatocellular carcinoma and their roles in chemo/radiotherapy. Tumor Biology *37*, 12339-12346.
Lin, W., Ame, J.C., Aboul-Ela, N., Jacobson, E.L., and Jacobson, M.K. (1997). Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine poly(ADP-ribose) glycohydrolase. J Biol Chem *272*, 11895-11901.

Lindahl, T. (1974). An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. Proc Natl Acad Sci U S A *71*, 3649-3653.
Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature *362*, 709-715.
Lindahl, T., and Wood, R.D. (1999). Quality control by DNA repair. Science *286*, 1897-1905.
Lindgren, A.E.G., Karlberg, T., Thorsell, A.-G., Hesse, M., Spjut, S., Ekblad, T., Andersson, C.D., Pinto, A.F., Weigelt, J., Hottiger, M.O*., et al.* (2013). PARP Inhibitor with Selectivity Toward ADP-Ribosyltransferase ARTD3/PARP3. ACS Chemical Biology *8*, 1698-1703.
Litchfield, D.W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. Biochemical Journal *369*, 1-15.
Liu, C., Yin, Q., Li, L., Jiao, G., Wang, M., and Wang, Y. (2013). XRCC1 Arg194Trp and Arg280His Polymorphisms in Bladder Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis. *23*, 339-354.
Llorente, B., and Symington, L.S. (2004). The Mre11 nuclease is not required for 5' to 3' resection at multiple HO-induced double-strand breaks. Mol Cell Biol *24*, 9682-9694.
Lloyd, J., Chapman, J.R., Clapperton, J.A., Haire, L.F., Hartsuiker, E., Li, J., Carr, A.M., Jackson, S.P., and Smerdon, S.J. (2009). A supramodular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage. Cell *139*, 100-111.
Loizou, J.I., El-Khamisy, S.F., Zlatanou, A., Moore, D.J., Chan, D.W., Qin, J., Sarno, S., Meggio, F., Pinna, L.A., and Caldecott, K.W. (2004). The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. Cell *117*, 17-28.
London, R.E. (2015). The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair. DNA Repair (Amst) *30*, 90-103.
Lonskaya, I., Potaman, V.N., Shlyakhtenko, L.S., Oussatcheva, E.A., Lyubchenko, Y.L., and Soldatenkov, V.A. (2005). Regulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. Journal of Biological Chemistry *280*, 17076-17083.
Loseva, O., Jemth, A.-S., Bryant, H.E., Schüler, H., Lehtiö, L., Karlberg, T., and Helleday, T. (2010a). PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA. Journal of Biological Chemistry *285*, 8054-8060.
Lu, M., Mani, R.S., Karimi-Busheri, F., Fanta, M., Wang, H., Litchfeld, D.W., and Weinfeld, M. (2010). Independent mechanisms of stimulation of polynucleotide kinase/phosphatase by phosphorylated and non-phosphorylated XRCC1. Nucleic Acids Research *38*, 510-521.
Luijsterburg, M.S., de Krijger, I., Wiegant, W.W., Shah, R.G., Smeenk, G., de Groot, A.J., Pines, A., Vertegaal, A.C., Jacobs, J.J., Shah, G.M*., et al.* (2016a). PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining. Mol Cell *61*, 547-562.
Luna, A., Aladjem, M.I., and Kohn, K.W. (2013). SIRT1/PARP1 crosstalk: connecting DNA damage and metabolism. Genome Integrity *4*, 6.
Luo, G., Yao, M.S., Bender, C.F., Mills, M., Bladl, A.R., Bradley, A., and Petrini, J.H. (1999). Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 7376-7381.
Luo, H., Chan, D.W., Yang, T., Rodriguez, M., Chen, B.P.-C., Leng, M., Mu, J.-J., Chen, D., Songyang, Z., Wang, Y*., et al.* (2004). A New XRCC1-Containing Complex and Its Role in Cellular Survival of Methyl Methanesulfonate Treatment. Molecular and Cellular Biology *24*, 8356-8365.
Ma, J.-L., Kim, E.M., Haber, J.E., and Lee, S.E. (2003a). Yeast Mre11 and Rad1 Proteins Define a Ku-Independent Mechanism To Repair Double-Strand Breaks Lacking Overlapping End Sequences. Molecular and Cellular Biology *23*, 8820-8828.
Ma, Q., Baldwin, K.T., Renzelli, A.J., McDaniel, A., and Dong, L. (2001). TCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase: a novel response to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Biochemical and biophysical research communications *289*, 499-506.

Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. Cell *108*, 781-794.
Mahaney, B.L., Hammel, M., Meek, K., Tainer, J.A., and Lees-Miller, S.P. (2013). XRCC4 and XLF form long helical protein filaments suitable for DNA end protection and alignment to facilitate DNA double strand break repair. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire *91*, 31-41.
Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. Cell *131*, 887-900.
Makharashvili, N., Tubbs, A.T., Yang, S.H., Wang, H., Barton, O., Zhou, Y., Deshpande, R.A., Lee, J.H., Lobrich, M., Sleckman, B.P.*, et al.* (2014). Catalytic and noncatalytic roles of the CtIP endonuclease in double-strand break end resection. Mol Cell *54*, 1022-1033.
Malanga, M., Czubaty, A., Girstun, A., Staron, K., and Althaus, F.R. (2008). Poly(ADP-ribose) binds to the splicing factor ASF/SF2 and regulates its phosphorylation by DNA topoisomerase I. J Biol Chem *283*, 19991-19998.
Malanga, M., Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., and Althaus, F.R. (1998). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. J Biol Chem *273*, 11839-11843.
Malkova, A., and Ira, G. (2013). Break-induced replication: functions and molecular mechanism. Current Opinion in Genetics & Development *23*, 271-279.
Mallette, F.A., Mattiroli, F., Cui, G., Young, L.C., Hendzel, M.J., Mer, G., Sixma, T.K., and Richard, S. (2012). RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. Embo j *31*, 1865-1878.
Mani, R.S., Fanta, M., Karimi-Busheri, F., Silver, E., Virgen, C.A., Caldecott, K.W., Cass, C.E., and Weinfeld, M. (2007). XRCC1 Stimulates Polynucleotide Kinase by Enhancing Its Damage Discrimination and Displacement from DNA Repair Intermediates. Journal of Biological Chemistry *282*, 28004-28013.
Mani, R.S., Yu, Y., Fang, S., Lu, M., Fanta, M., Zolner, A.E., Tahbaz, N., Ramsden, D.A., Litchfield, D.W., Lees-Miller, S.P.*, et al.* (2010). Dual modes of interaction between XRCC4 and polynucleotide kinase/phosphatase: implications for nonhomologous end joining. J Biol Chem *285*, 37619-37629.
Mansour, W.Y., Borgmann, K., Petersen, C., Dikomey, E., and Dahm-Daphi, J. (2013). The absence of Ku but not defects in classical non-homologous end-joining is required to trigger PARP1-dependent end-joining. DNA Repair (Amst) *12*, 1134-1142.
Mansour, W.Y., Rhein, T., and Dahm-Daphi, J. (2010). The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. Nucleic Acids Res *38*, 6065-6077.
Mao, Z., Hine, C., Tian, X., Van Meter, M., Au, M., Vaidya, A., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2011). SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. Science *332*, 1443-1446.
Marechal, A., and Zou, L. (2015). RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. Cell research *25*, 9-23.
Mari, P.O., Florea, B.I., Persengiev, S.P., Verkaik, N.S., Bruggenwirth, H.T., Modesti, M., Giglia-Mari, G., Bezstarosti, K., Demmers, J.A., Luider, T.M.*, et al.* (2006). Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 18597-18602.
Marintchev, A., Gryk, M.R., and Mullen, G.P. (2003). Site-directed mutagenesis analysis of the structural interaction of the single-strand-break repair protein, X-ray cross-complementing group 1, with DNA polymerase beta. Nucleic Acids Res *31*, 580-588.
Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F.H. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. The FEBS journal *272*, 2118-2131.

Marsin, S., Vidal, A.E., Sossou, M., Ménissier-de Murcia, J., Le Page, F., Boiteux, S., de Murcia, G., and Radicella, J.P. (2003). Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. Journal of Biological Chemistry *278*, 44068-44074.
Marsischky, G.T., Wilson, B.A., and Collier, R.J. (1995). Role of Glutamic Acid 988 of Human Poly-ADP-ribose Polymerase in Polymer Formation: EVIDENCE FOR ACTIVE SITE SIMILARITIES TO THE ADP-RIBOSYLATING TOXINS. Journal of Biological Chemistry *270*, 3247-3254.
Martello, R., Leutert, M., Jungmichel, S., Bilan, V., Larsen, S.C., Young, C., Hottiger, M.O., and Nielsen, M.L. (2016a). Proteome-wide identification of the endogenous ADP-ribosylome of mammalian cells and tissue. Nature Communications *7*, 12917.
Martino-Echarri, E., Brocardo, M.G., Mills, K.M., and Henderson, B.R. (2016). Tankyrase Inhibitors Stimulate the Ability of Tankyrases to Bind Axin and Drive Assembly of beta-Catenin Degradation-Competent Axin Puncta. PloS one *11*, e0150484.
Mashimo, M., Kato, J., and Moss, J. (2013). ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 regulates poly (ADP-ribose) degradation and cell death during oxidative stress. Proc Natl Acad Sci U S A *110*, 18964-18969.
Massip, L., Caron, P., Iacovoni, J.S., Trouche, D., and Legube, G. (2010). Deciphering the chromatin landscape induced around DNA double strand breaks. Cell Cycle *9*, 2963-2972.
Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1998a). XRCC1 is specifically associated with poly (ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. Molecular and cellular biology *18*, 3563-3571.
Mateos-Gomez, P.A., Gong, F., Nair, N., Miller, K.M., Lazzerini-Denchi, E., and Sfeir, A. (2015). Mammalian polymerase [thgr] promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. Nature *518*, 254-257.
Matsumoto, Y., and Kim, K. (1995). Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. Science *269*, 699-702.
Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S.J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. Science *282*, 1893-1897.
Mattarocci, S., Reinert, J.K., Bunker, R.D., Fontana, G.A., Shi, T., Klein, D., Cavadini, S., Faty, M., Shyian, M., Hafner, L.*, et al.* (2017). Rif1 maintains telomeres and mediates DNA repair by encasing DNA ends. Nat Struct Mol Biol *advance online publication*.
Mattiroli, F., Vissers, J.H., van Dijk, W.J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., Marteijn, J.A., and Sixma, T.K. (2012). RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. Cell *150*, 1182-1195.
Mayya, V., Lundgren, D.H., Hwang, S.I., Rezaul, K., Wu, L., Eng, J.K., Rodionov, V., and Han, D.K. (2009). Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. Sci Signal *2*, ra46.
McCaw, B.K., Hecht, F., Harnden, D.G., and Teplitz, R.L. (1975). Somatic rearrangement of chromosome 14 in human lymphocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences *72*, 2071-2075.
McKee, A.H., and Kleckner, N. (1997). A general method for identifying recessive diploid-specific mutations in Saccharomyces cerevisiae, its application to the isolation of mutants blocked at intermediate stages of meiotic prophase and characterization of a new gene SAE2. Genetics *146*, 797-816.
McMurray, M.A., and Gottschling, D.E. (2003). An age-induced switch to a hyper-recombinational state. Science *301*, 1908-1911.
McNeill, D.R., Lin, P.-C., Miller, M.G., Pistell, P.J., de Souza-Pinto, N.C., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Liu, Y., Pettan-Brewer, C., and Ladiges, W.C. (2011). XRCC1 haploinsufficiency in mice has little effect on aging, but adversely modifies exposure-dependent susceptibility. Nucleic acids research, gkr280.

Meder, V.S., Boeglin, M., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2005). PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli. Journal of cell science *118*, 211-222.
Mendes-Pereira, A.M., Martin, S.A., Brough, R., McCarthy, A., Taylor, J.R., Kim, J.S., Waldman, T., Lord, C.J., and Ashworth, A. (2009). Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. EMBO molecular medicine *1*, 315-322.
Mendoza-Alvarez, H., and Alvarez-Gonzalez, R. (1993). Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular. J Biol Chem *268*, 22575-22580.
Menissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Ame, J.C., Dierich, A., LeMeur, M.*, et al.* (2003). Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. Embo j *22*, 2255-2263.
Messner, S., Altmeyer, M., Zhao, H., Pozivil, A., Roschitzki, B., Gehrig, P., Rutishauser, D., Huang, D., Caflisch, A., and Hottiger, M.O. (2010). PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. Nucleic Acids Research *38*, 6350-6362.
Meyer-Ficca, M.L., Ihara, M., Bader, J.J., Leu, N.A., Beneke, S., and Meyer, R.G. (2015). Spermatid head elongation with normal nuclear shaping requires ADP-ribosyltransferase PARP11 (ARTD11) in mice. Biology of reproduction *92*, 80.
Miller, J.H., and Goodman, M.F. (2016). Tomas Lindahl: 2015 Nobel Laureate. DNA Repair (Amst) *37*, A29-34.
Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. Nature *455*, 770-774.
Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2010). Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. Embo j *29*, 3358-3369.
Min, W., Bruhn, C., Grigaravicius, P., Zhou, Z.W., Li, F., Kruger, A., Siddeek, B., Greulich, K.O., Popp, O., Meisezahl, C.*, et al.* (2013). Poly(ADP-ribose) binding to Chk1 at stalled replication forks is required for S-phase checkpoint activation. Nat Commun *4*, 2993.
Mitra, S., Izumi, T., Boldogh, I., Bhakat, K.K., Chattopadhyay, R., and Szczesny, B. (2007). Intracellular trafficking and regulation of mammalian AP-endonuclease 1 (APE1), an essential DNA repair protein. DNA repair *6*, 461-469.
Mockel, C., Lammens, K., Schele, A., and Hopfner, K.P. (2012). ATP driven structural changes of the bacterial Mre11:Rad50 catalytic head complex. Nucleic Acids Res *40*, 914-927.
Mohamed, J.S., Hajira, A., Pardo, P.S., and Boriek, A.M. (2014). MicroRNA-149 inhibits PARP-2 and promotes mitochondrial biogenesis via SIRT-1/PGC-1alpha network in skeletal muscle. Diabetes *63*, 1546-1559.
Moon, A.F., Garcia-Diaz, M., Batra, V.K., Beard, W.A., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wilson, S.H., and Pedersen, L.C. (2007). The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases. DNA Repair (Amst) *6*, 1709-1725.
Moore, D.J., Taylor, R.M., Clements, P., and Caldecott, K.W. (2000). Mutation of a BRCT domain selectively disrupts DNA single-strand break repair in noncycling Chinese hamster ovary cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 13649-13654.
Moreira, M.C., Barbot, C., Tachi, N., Kozuka, N., Uchida, E., Gibson, T., Mendonca, P., Costa, M., Barros, J., Yanagisawa, T.*, et al.* (2001). The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. Nature genetics *29*, 189-193.
Morgan, W.F., and Cleaver, J.E. (1983). Effect of 3-aminobenzamide on the rate of ligation during repair of alkylated DNA in human fibroblasts. Cancer research *43*, 3104-3107.
Morin, G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell *59*, 521-529.

Mortusewicz, O., Ame, J.C., Schreiber, V., and Leonhardt, H. (2007). Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. Nucleic Acids Res *35*, 7665-7675.
Mortusewicz, O., Fouquerel, E., Amé, J.-C., Leonhardt, H., and Schreiber, V. (2011a). PARG is recruited to DNA damage sites through poly(ADP-ribose)- and PCNA-dependent mechanisms. Nucleic Acids Research *39*, 5045-5056.
Mosavi, L.K., Cammett, T.J., Desrosiers, D.C., and Peng, Z.-y. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. Protein Science *13*, 1435-1448.
Motycka, T.A., Bessho, T., Post, S.M., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2004). Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. J Biol Chem *279*, 13634-13639.
Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H., and Jasin, M. (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. Molecular cell *4*, 511-518.
Mueller-Dieckmann, C., Kernstock, S., Lisurek, M., von Kries, J.P., Haag, F., Weiss, M.S., and Koch-Nolte, F. (2006). The structure of human ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3) provides insights into the reversibility of protein ADP-ribosylation. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 15026-15031.
Munoz, I.M., Jowsey, P.A., Toth, R., and Rouse, J. (2007). Phospho-epitope binding by the BRCT domains of hPTIP controls multiple aspects of the cellular response to DNA damage. Nucleic Acids Res *35*, 5312-5322.
Munoz, M.C., Laulier, C., Gunn, A., Cheng, A., Robbiani, D.F., Nussenzweig, A., and Stark, J.M. (2012). RING finger nuclear factor RNF168 is important for defects in homologous recombination caused by loss of the breast cancer susceptibility factor BRCA1. J Biol Chem *287*, 40618-40628.
Murai, J., Huang, S.-y.N., Das, B.B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J.H., Ji, J., Takeda, S., and Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. Cancer research *72*, 5588.
Murai, J., Zhang, Y., Morris, J., Ji, J., Takeda, S., Doroshow, J.H., and Pommier, Y. (2014). Rationale for Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors in Combination Therapy with Camptothecins or Temozolomide Based on PARP Trapping versus Catalytic Inhibition. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics *349*, 408.
Murzin, A.G. (1993). OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. Embo j *12*, 861-867.
Nairz, K., and Klein, F. (1997). mre11S--a yeast mutation that blocks double-strand-break processing and permits nonhomologous synapsis in meiosis. Genes Dev *11*, 2272-2290.
Nakada, D., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2003). ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. Genes Dev *17*, 1957-1962.
Nakamura, K., Kogame, T., Oshiumi, H., Shinohara, A., Sumitomo, Y., Agama, K., Pommier, Y., Tsutsui, K.M., Tsutsui, K., Hartsuiker, E*., et al.* (2010). Collaborative action of Brca1 and CtIP in elimination of covalent modifications from double-strand breaks to facilitate subsequent break repair. PLoS genetics *6*, e1000828.
Nakamura, K., Sakai, W., Kawamoto, T., Bree, R.T., Lowndes, N.F., Takeda, S., and Taniguchi, Y. (2006). Genetic dissection of vertebrate 53BP1: a major role in non-homologous end joining of DNA double strand breaks. DNA Repair (Amst) *5*, 741-749.
Narciso, L., Fortini, P., Pajalunga, D., Franchitto, A., Liu, P., Degan, P., Frechet, M., Demple, B., Crescenzi, M., and Dogliotti, E. (2007). Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury. Proceedings of the National Academy of Sciences *104*, 17010-17015.
Nash, H.M., Lu, R., Lane, W.S., and Verdine, G.L. (1997). The critical active-site amine of the human 8-oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: direct identification, ablation and chemical reconstitution. Chem Biol *4*, 693-702.

Nathanson, K.L., Wooster, R., and Weber, B.L. (2001). Breast cancer genetics: what we know and what we need. Nat Med *7*, 552-556.
Navarro, J., Gozalbo-Lopez, B., Mendez, A.C., Dantzer, F., Schreiber, V., Martinez, C., Arana, D.M., Farres, J., Revilla-Nuin, B., Bueno, M.F.*, et al.* (2017). PARP-1/PARP-2 double deficiency in mouse T cells results in faulty immune responses and T lymphomas. Sci Rep *7*, 41962.
Neale, M.J., Pan, J., and Keeney, S. (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. Nature *436*, 1053-1057.
Nick McElhinny, S.A., Snowden, C.M., McCarville, J., and Ramsden, D.A. (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. Mol Cell Biol *20*, 2996-3003.
Nicolae, C.M., Aho, E.R., Vlahos, A.H., Choe, K.N., De, S., Karras, G.I., and Moldovan, G.L. (2014). The ADP-ribosyltransferase PARP10/ARTD10 interacts with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and is required for DNA damage tolerance. J Biol Chem *289*, 13627-13637.
Niere, M., Mashimo, M., Agledal, L., Dolle, C., Kasamatsu, A., Kato, J., Moss, J., and Ziegler, M. (2012). ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3), not poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) isoforms, is responsible for degradation of mitochondrial matrix-associated poly(ADP-ribose). J Biol Chem *287*, 16088-16102.
Nishizuka, Y., Ueda, K., Nakazawa, K., and Hayaishi, O. (1967). Studies on the Polymer of Adenosine Diphosphate Ribose I. ENZYMIC FORMATION FROM NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE IN MAMMALIAN NUCLEI. Journal of Biological Chemistry *242*, 3164-3171.
Niu, H., Chung, W.H., Zhu, Z., Kwon, Y., Zhao, W., Chi, P., Prakash, R., Seong, C., Liu, D., Lu, L.*, et al.* (2010). Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from Saccharomyces cerevisiae. Nature *467*, 108-111.
Noel, G., Giocanti, N., Fernet, M., Megnin-Chanet, F., and Favaudon, V. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is not involved in DNA double-strand break recovery. BMC Cell Biol *4*, 7.
Noon, A.T., Shibata, A., Rief, N., Lobrich, M., Stewart, G.S., Jeggo, P.A., and Goodarzi, A.A. (2010). 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. Nat Cell Biol *12*, 177-184.
Obaji, E., Haikarainen, T., and Lehtio, L. (2016). Characterization of the DNA dependent activation of human ARTD2/PARP2. Sci Rep *6*, 34487.
Oberoi, J., Richards, M.W., Crumpler, S., Brown, N., Blagg, J., and Bayliss, R. (2010). Structural basis of poly(ADP-ribose) recognition by the multizinc binding domain of checkpoint with forkhead-associated and RING Domains (CHFR). J Biol Chem *285*, 39348-39358.
Ochi, T., Blackford, A.N., Coates, J., Jhujh, S., Mehmood, S., Tamura, N., Travers, J., Wu, Q., Draviam, V.M., Robinson, C.V.*, et al.* (2015). DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. Science *347*, 185-188.
Ohshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veeranna, Pant, H.C., Brady, R.O., Martin, L.J., and Kulkarni, A.B. (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 11173-11178.
Oka, S., Kato, J., and Moss, J. (2006). Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. J Biol Chem *281*, 705-713.
Okano, S., Lan, L., Caldecott, K.W., Mori, T., and Yasui, A. (2003). Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. Mol Cell Biol *23*, 3974-3981.
Okayama, H., Edson, C., Fukushima, M., Ueda, K., and Hayaishi, O. (1977). Purification and properties of poly (adenosine diphosphate ribose) synthetase. Journal of Biological Chemistry *252*, 7000-7005.
Oliver, A.W., Ame, J.C., Roe, S.M., Good, V., de Murcia, G., and Pearl, L.H. (2004). Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2. Nucleic Acids Res *32*, 456-464.
Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. Cell *127*, 635-648.

Oplustil O'Connor, L., Rulten, S.L., Cranston, A.N., Odedra, R., Brown, H., Jaspers, J.E., Jones, L., Knights, C., Evers, B., Ting, A.*, et al.* (2016). The PARP Inhibitor AZD2461 Provides Insights into the Role of PARP3 Inhibition for Both Synthetic Lethality and Tolerability with Chemotherapy in Preclinical Models. Cancer research *76*, 6084-6094.
Orel, N., Kyryk, A., and Puchta, H. (2003). Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. The Plant Journal *35*, 604-612.
Orsburn, B., Escudero, B., Prakash, M., Gesheva, S., Liu, G., Huso, D.L., and Franco, S. (2010). Differential Requirement for H2AX and 53BP1 in Organismal Development and Genome Maintenance in the Absence of Poly(ADP)ribosyl Polymerase 1. Molecular and Cellular Biology *30*, 2341-2352.
Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S.M., Canny, M.D., Brun, C.M., Strecker, J., Escribano-Diaz, C., and Durocher, D. (2014). Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. Science *344*, 189-193.
Orthwein, A., Noordermeer, S.M., Wilson, M.D., Landry, S., Enchev, R.I., Sherker, A., Munro, M., Pinder, J., Salsman, J., Dellaire, G.*, et al.* (2015). A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. Nature *528*, 422-426.
Otterlei, M., Warbrick, E., Nagelhus, T.A., Haug, T., Slupphaug, G., Akbari, M., Aas, P.A., Steinsbekk, K., Bakke, O., and Krokan, H.E. (1999). Post-replicative base excision repair in replication foci. The EMBO Journal *18*, 3834.
Otto, H., Reche, P.A., Bazan, F., Dittmar, K., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2005). In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). BMC genomics *6*, 139.
Page, S.L., and Hawley, R.S. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. Science *301*, 785-789.
Pan, C., Olsen, J.V., Daub, H., and Mann, M. (2009). Global effects of kinase inhibitors on signaling networks revealed by quantitative phosphoproteomics. Molecular & cellular proteomics : MCP *8*, 2796-2808.
Pan, M.R., Hsieh, H.J., Dai, H., Hung, W.C., Li, K., Peng, G., and Lin, S.Y. (2012). Chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4) regulates homologous recombination DNA repair, and its deficiency sensitizes cells to poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor treatment. J Biol Chem *287*, 6764-6772.
Pang, D., Yoo, S., Dynan, W.S., Jung, M., and Dritschilo, A. (1997). Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. Cancer research *57*, 1412-1415.
Panier, S., and Durocher, D. (2013). Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. Nat Rev Mol Cell Biol *14*, 661-672.
Panier, S., Ichijima, Y., Fradet-Turcotte, A., Leung, C.C., Kaustov, L., Arrowsmith, C.H., and Durocher, D. (2012). Tandem protein interaction modules organize the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand breaks. Mol Cell *47*, 383-395.
Panzeter, P.L., and Althaus, F.R. (1994). DNA Strand Break-Mediated Partitioning of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Function. Biochemistry *33*, 9600-9605.
Park, S.-Y., Lam, W., and Cheng, Y.-c. (2002). X-ray repair cross-complementing gene I protein plays an important role in camptothecin resistance. Cancer research *62*, 459-465.
Park, S.C., Hwang, U.K., Ahn, S.H., Gong, G.Y., and Yoon, H.S. (2007). Genetic changes in bilateral breast cancer by comparative genomic hybridisation. Clinical and Experimental Medicine *7*, 1-5.
Parlanti, E., Locatelli, G., Maga, G., and Dogliotti, E. (2007). Human base excision repair complex is physically associated to DNA replication and cell cycle regulatory proteins. Nucleic Acids Res *35*, 1569-1577.
Parsons, J.L., and Dianov, G.L. (2013). Co-ordination of base excision repair and genome stability. DNA Repair (Amst) *12*, 326-333.
Parsons, J.L., Dianova, II, and Dianov, G.L. (2004a). APE1 is the major 3'-phosphoglycolate activity in human cell extracts. Nucleic acids research *32*, 3531-3536.

Parsons, J.L., Dianova, I.I., Finch, D., Tait, P.S., Ström, C.E., Helleday, T., and Dianov, G.L. (2010). XRCC1 phosphorylation by CK2 is required for its stability and efficient DNA repair. DNA Repair *9*, 835-841.
Parsons, J.L., Tait, P.S., Finch, D., Dianova, I.I., Allinson, S.L., and Dianov, G.L. (2008). CHIP-Mediated Degradation and DNA Damage-Dependent Stabilization Regulate Base Excision Repair Proteins. Molecular Cell *29*, 477-487.
Patel, A., Lee, H.O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M.Y., Stoynov, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T.M.*, et al.* (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. Cell *162*, 1066-1077.
Patel, A.G., Sarkaria, J.N., and Kaufmann, S.H. (2011). Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 3406-3411.
Paudyal, S.C., and You, Z. (2016). Sharpening the ends for repair: mechanisms and regulation of DNA resection. Acta Biochimica et Biophysica Sinica *48*, 647-657.
Paull, T.T., and Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. Mol Cell *1*, 969-979.
Paull, T.T., and Gellert, M. (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. Genes Dev *13*, 1276-1288.
Pellegrini, L., Yu, D.S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T.L., and Venkitaraman, A.R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. Nature *420*, 287-293.
Pellegrino, S., Michelena, J., Teloni, F., Imhof, R., and Altmeyer, M. (2017). Replication-Coupled Dilution of H4K20me2 Guides 53BP1 to Pre-replicative Chromatin. Cell Rep *19*, 1819-1831.
Pentao, L., Wise, C.A., Chinault, A.C., Patel, P.I., and Lupski, J.R. (1992). Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit. Nature genetics *2*, 292-300.
Perina, D., Mikoč, A., Ahel, J., Ćetković, H., Žaja, R., and Ahel, I. (2014). Distribution of protein poly(ADP-ribosyl)ation systems across all domains of life. DNA Repair *23*, 4-16.
Perry, J.J., Yannone, S.M., Holden, L.G., Hitomi, C., Asaithamby, A., Han, S., Cooper, P.K., Chen, D.J., and Tainer, J.A. (2006). WRN exonuclease structure and molecular mechanism imply an editing role in DNA end processing. Nat Struct Mol Biol *13*, 414-422.
Pesavento, J.J., Yang, H., Kelleher, N.L., and Mizzen, C.A. (2008). Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle. Mol Cell Biol *28*, 468-486.
Petermann, E., Keil, C., and Oei, S.L. (2006). Roles of DNA ligase III and XRCC1 in regulating the switch between short patch and long patch BER. DNA Repair *5*, 544-555.
Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. Mol Cell *37*, 492-502.
Peterson, S.E., Li, Y., Wu-Baer, F., Chait, B.T., Baer, R., Yan, H., Gottesman, M.E., and Gautier, J. (2013). Activation of DSB processing requires phosphorylation of CtIP by ATR. Mol Cell *49*, 657-667.
Petrini, J.H., Walsh, M.E., DiMare, C., Chen, X.N., Korenberg, J.R., and Weaver, D.T. (1995). Isolation and characterization of the human MRE11 homologue. Genomics *29*, 80-86.
Petrucelli, N., Daly, M.B., and Feldman, G.L. (2013). BRCA1 and BRCA2 hereditary breast and ovarian cancer.
Pettitt, S.J., Rehman, F.L., Bajrami, I., Brough, R., Wallberg, F., Kozarewa, I., Fenwick, K., Assiotis, I., Chen, L., Campbell, J.*, et al.* (2013). A genetic screen using the PiggyBac transposon in haploid cells identifies Parp1 as a mediator of olaparib toxicity. PloS one *8*, e61520.
Pfister, S.X., Ahrabi, S., Zalmas, L.P., Sarkar, S., Aymard, F., Bachrati, C.Z., Helleday, T., Legube, G., La Thangue, N.B., Porter, A.C.*, et al.* (2014). SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability. Cell Rep *7*, 2006-2018.

Pierce, A.J., Hu, P., Han, M., Ellis, N., and Jasin, M. (2001). Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. Genes Dev *15*, 3237-3242.
Pierce, A.J., Johnson, R.D., Thompson, L.H., and Jasin, M. (1999). XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. Genes Dev *13*, 2633-2638.
Pillai, J.B., Isbatan, A., Imai, S., and Gupta, M.P. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD+ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. J Biol Chem *280*, 43121-43130.
Pillaire, M.J., Selves, J., Gordien, K., Gourraud, P.A., Gentil, C., Danjoux, M., Do, C., Negre, V., Bieth, A., Guimbaud, R.*, et al.* (2010). A 'DNA replication' signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. Oncogene *29*, 876-887.
Pinato, S., Gatti, M., Scandiuzzi, C., Confalonieri, S., and Penengo, L. (2011). UMI, a novel RNF168 ubiquitin binding domain involved in the DNA damage signaling pathway. Mol Cell Biol *31*, 118-126.
Pion, E., Bombarda, E., Stiegler, P., Ullmann, G.M., Mély, Y., de Murcia, G., and Gérard, D. (2003). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 dimerizes at a 5 'recessed DNA end in vitro: a fluorescence study. Biochemistry *42*, 12409-12417.
Pion, E., Ullmann, G.M., Amé, J.-C., Gérard, D., de Murcia, G., and Bombarda, E. (2005). DNA-Induced Dimerization of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Triggers Its Activation. Biochemistry *44*, 14670-14681.
Plans, V., Scheper, J., Soler, M., Loukili, N., Okano, Y., and Thomson, T.M. (2006). The RING finger protein RNF8 recruits UBC13 for lysine 63-based self polyubiquitylation. J Cell Biochem *97*, 572-582.
Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., and Althaus, F.R. (2000a). Poly(ADP-ribose) Binds to Specific Domains in DNA Damage Checkpoint Proteins. Journal of Biological Chemistry *275*, 40974-40980.
Plo, I., Liao, Z.-Y., Barceló, J.M., Kohlhagen, G., Caldecott, K.W., Weinfeld, M., and Pommier, Y. (2003). Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. DNA Repair *2*, 1087-1100.
Poirier, G.G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C., and Mandel, P. (1982). Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. Proc Natl Acad Sci U S A *79*, 3423-3427.
Polato, F., Callen, E., Wong, N., Faryabi, R., Bunting, S., Chen, H.T., Kozak, M., Kruhlak, M.J., Reczek, C.R., Lee, W.H.*, et al.* (2014). CtIP-mediated resection is essential for viability and can operate independently of BRCA1. J Exp Med *211*, 1027-1036.
Pommier, Y. (2013). Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges. ACS Chemical Biology *8*, 82-95.
Pommier, Y., Barcelo, J.M., Rao, V.A., Sordet, O., Jobson, A.G., Thibaut, L., Miao, Z.H., Seiler, J.A., Zhang, H., Marchand, C.*, et al.* (2006). Repair of Topoisomerase I-Mediated DNA Damage. In Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (Academic Press), pp. 179-229.
Pontier, D.B., and Tijsterman, M. (2009a). A robust network of double-strand break repair pathways governs genome integrity during C. elegans development. Current biology : CB *19*, 1384-1388.
Popanda, O., Seibold, P., Nikolov, I., Oakes, C.C., Burwinkel, B., Hausmann, S., Flesch-Janys, D., Plass, C., Chang-Claude, J., and Schmezer, P. (2013). Germline variants of base excision repair genes and breast cancer: A polymorphism in DNA polymerase gamma modifies gene expression and breast cancer risk. International journal of cancer *132*, 55-62.
Pouliot, J.J., Yao, K.C., Robertson, C.A., and Nash, H.A. (1999). Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. Science *286*, 552-555.
Povirk, L.F., Zhou, T., Zhou, R., Cowan, M.J., and Yannone, S.M. (2007). Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease. J Biol Chem *282*, 3547-3558.
Powell, S.N., and Kachnic, L.A. (2003). Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. Oncogene *22*, 5784-5791.

Pozo, K., Castro-Rivera, E., Tan, C., Plattner, F., Schwach, G., Siegl, V., Meyer, D., Guo, A., Gundara, J., Mettlach, G.*, et al.* (2013). The role of Cdk5 in neuroendocrine thyroid cancer. Cancer cell *24*, 499-511.
Prado, F., and Aguilera, A. (2005). Impairment of replication fork progression mediates RNA polII transcription-associated recombination. Embo j *24*, 1267-1276.
Prasad, R., Lavrik, O.I., Kim, S.J., Kedar, P., Yang, X.P., Vande Berg, B.J., and Wilson, S.H. (2001). DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. J Biol Chem *276*, 32411-32414.
Prinz, S., Amon, A., and Klein, F. (1997). Isolation of COM1, a new gene required to complete meiotic double-strand break-induced recombination in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *146*, 781-795.
Pryde, F., Khalili, S., Robertson, K., Selfridge, J., Ritchie, A.M., Melton, D.W., Jullien, D., and Adachi, Y. (2005). 53BP1 exchanges slowly at the sites of DNA damage and appears to require RNA for its association with chromatin. Journal of cell science *118*, 2043-2055.
Puebla-Osorio, N., Lacey, D.B., Alt, F.W., and Zhu, C. (2006). Early embryonic lethality due to targeted inactivation of DNA ligase III. Molecular and Cellular Biology *26*, 3935-3941.
Purnell, M.R., and Whish, W.J. (1980). Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. Biochemical Journal *185*, 775.
Qi, G., Kudo, Y., Tang, B., Liu, T., Jin, S., Liu, J., Zuo, X., Mi, S., Shao, W., Ma, X.*, et al.* (2016). PARP6 acts as a tumor suppressor via downregulating Survivin expression in colorectal cancer. Oncotarget *7*, 18812-18824.
Qin, C.J., Xu, K.W., Chen, Z.H., Zhai, E.T., He, Y.L., and Song, X.M. (2015). XRCC1 R399Q polymorphism and colorectal cancer risk in the Chinese Han population: a meta-analysis. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine *36*, 461-466.
Quénet, D., Gasser, V., Fouillen, L., Cammas, F., Sanglier-Cianferani, S., Losson, R., and Dantzer, F. (2008). The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1β and the heterochromatin protein HP1α. The FASEB Journal *22*, 3853-3865.
Rack, J.G., Perina, D., and Ahel, I. (2016). Macrodomains: Structure, Function, Evolution, and Catalytic Activities. Annu Rev Biochem *85*, 431-454.
Ramiro, A.R., Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H.-T., McBride, K.M., Eisenreich, T.R., Chen, J., Dickins, R.A., Lowe, S.W.*, et al.* (2006). Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc–Igh translocations. Nature *440*, 105-109.
Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. Nat Struct Mol Biol *16*, 819-824.
Rattray, A.J., McGill, C.B., Shafer, B.K., and Strathern, J.N. (2001). Fidelity of mitotic double-strand-break repair in Saccharomyces cerevisiae: a role for SAE2/COM1. Genetics *158*, 109-122.
Raval-Fernandes, S., Kickhoefer, V.A., Kitchen, C., and Rome, L.H. (2005). Increased susceptibility of vault poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice to carcinogen-induced tumorigenesis. Cancer research *65*, 8846-8852.
Ray Chaudhuri, A., Callen, E., Ding, X., Gogola, E., Duarte, A.A., Lee, J.-E., Wong, N., Lafarga, V., Calvo, J.A., Panzarino, N.J.*, et al.* (2016). Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. Nature *535*, 382-387.
Ray Chaudhuri, A., Hashimoto, Y., Herrador, R., Neelsen, K.J., Fachinetti, D., Bermejo, R., Cocito, A., Costanzo, V., and Lopes, M. (2012). Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. Nat Struct Mol Biol *19*, 417-423.
Reczek, C.R., Szabolcs, M., Stark, J.M., Ludwig, T., and Baer, R. (2013). The interaction between CtIP and BRCA1 is not essential for resection-mediated DNA repair or tumor suppression. J Cell Biol *201*, 693-707.
Renkawitz, J., Lademann, C.A., and Jentsch, S. (2014). Mechanisms and principles of homology search during recombination. Nat Rev Mol Cell Biol *15*, 369-383.

Riccio, A.A., Cingolani, G., and Pascal, J.M. (2016). PARP-2 domain requirements for DNA damage-dependent activation and localization to sites of DNA damage. Nucleic Acids Res *44*, 1691-1702.
Riffell, J.L., Lord, C.J., and Ashworth, A. (2012). Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. Nat Rev Drug Discov *11*, 923-936.
Riquelme, P., Burzio, L., and Koide, S. (1979). ADP ribosylation of rat liver lysine-rich histone in vitro. Journal of Biological Chemistry *254*, 3018-3028.
Rivera-Calzada, A., Spagnolo, L., Pearl, L.H., and Llorca, O. (2007). Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs. EMBO Rep *8*, 56-62.
Robert, I., Dantzer, F., and Reina-San-Martin, B. (2009). Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. J Exp Med *206*, 1047-1056.
Robert, I., Gaudot, L., Rogier, M., Heyer, V., Noll, A., Dantzer, F., and Reina-San-Martin, B. (2015). Parp3 negatively regulates immunoglobulin class switch recombination. PLoS genetics *11*, e1005240.
Robert, I., Gaudot, L., Yelamos, J., Noll, A., Wong, H.K., Dantzer, F., Schreiber, V., and Reina-San-Martin, B. (2017). Robust immunoglobulin class switch recombination and end joining in Parp9-deficient mice. European journal of immunology *47*, 665-676.
Roberts, S.A., Strande, N., Burkhalter, M.D., Strom, C., Havener, J.M., Hasty, P., and Ramsden, D.A. (2010). Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. Nature *464*, 1214-1217.
Robertson, K.A., Bullock, H.A., Xu, Y., Tritt, R., Zimmerman, E., Ulbright, T.M., Foster, R.S., Einhorn, L.H., and Kelley, M.R. (2001). Altered Expression of Ape1/ref-1 in Germ Cell Tumors and Overexpression in NT2 Cells Confers Resistance to Bleomycin and Radiation. Cancer research *61*, 2220.
Rosenstein, B.S. (2011). Identification of SNPs associated with susceptibility for development of adverse reactions to radiotherapy. Pharmacogenomics *12*, 267-275.
Rosenthal, F., Feijs, K.L.H., Frugier, E., Bonalli, M., Forst, A.H., Imhof, R., Winkler, H.C., Fischer, D., Caflisch, A., Hassa, P.O.*, et al.* (2013). Macrodomain-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. Nat Struct Mol Biol *20*, 502-507.
Rothenberg, E., Grimme, J.M., Spies, M., and Ha, T. (2008). Human Rad52-mediated homology search and annealing occurs by continuous interactions between overlapping nucleoprotein complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 20274-20279.
Rottenberg, S., Jaspers, J.E., Kersbergen, A., van der Burg, E., Nygren, A.O., Zander, S.A., Derksen, P.W., de Bruin, M., Zevenhoven, J., Lau, A.*, et al.* (2008). High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 17079-17084.
Rouleau, M., McDonald, D., Gagne, P., Ouellet, M.E., Droit, A., Hunter, J., Dutertre, S., Prigent, C., Hendzel, M., and Poirier, G. (2007a). PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery. Journal of cellular biochemistry *100*, 385-401.
Rouleau, M., Saxena, V., Rodrigue, A., Paquet, E.R., Gagnon, A., Hendzel, M.J., Masson, J.Y., Ekker, M., and Poirier, G.G. (2011). A key role for poly(ADP-ribose) polymerase 3 in ectodermal specification and neural crest development. PloS one *6*, e15834.
Ruf, A., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1998a). Inhibitor and NAD+ Binding to Poly(ADP-ribose) Polymerase As Derived from Crystal Structures and Homology Modeling. Biochemistry *37*, 3893-3900.
Ruf, A., Mennissier de Murcia, J., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1996). Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. Proceedings of the National Academy of Sciences *93*, 7481-7485.
Ruf, A., Rolli, V., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1998b). The mechanism of the elongation and branching reaction of poly (ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. Journal of molecular biology *278*, 57-65.

Rulten, S.L., Fisher, A.E., Robert, I., Zuma, M.C., Rouleau, M., Ju, L., Poirier, G., Reina-San-Martin, B., and Caldecott, K.W. (2011). PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. Mol Cell *41*, 33-45.
Rybanska, I., Ishaq, O., Chou, J., Prakash, M., Bakhsheshian, J., Huso, D.L., and Franco, S. (2013). PARP1 and DNA-PKcs synergize to suppress p53 mutation and telomere fusions during T-lineage lymphomagenesis. Oncogene *32*, 1761-1771.
Rzeszowska-Wolny, J., Polanska, J., Pietrowska, M., Palyvoda, O., Jaworska, J., Butkiewicz, D., and Hancock, R. (2005). Influence of polymorphisms in DNA repair genes XPD, XRCC1 and MGMT on DNA damage induced by gamma radiation and its repair in lymphocytes in vitro. Radiation research *164*, 132-140.
Sakai, W., Swisher, E.M., Karlan, B.Y., Agarwal, M.K., Higgins, J., Friedman, C., Villegas, E., Jacquemont, C., Farrugia, D.J., Couch, F.J.*, et al.* (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. Nature *451*, 1116-1120.
Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annual review of biochemistry *73*, 39-85.
Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. Nature *450*, 509-514.
Sattler, U., Frit, P., Salles, B., and Calsou, P. (2003). Long-patch DNA repair synthesis during base excision repair in mammalian cells. EMBO reports *4*, 363.
Saxena, A., Wong, L.H., Kalitsis, P., Earle, E., Shaffer, L.G., and Choo, K.H.A. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc. Human Molecular Genetics *11*, 2319-2329.
Schiewer, M.J., and Knudsen, K.E. (2014). Transcriptional Roles of PARP1 in Cancer. Molecular Cancer Research *12*, 1069-1080.
Schotta, G., Sengupta, R., Kubicek, S., Malin, S., Kauer, M., Callen, E., Celeste, A., Pagani, M., Opravil, S., De La Rosa-Velazquez, I.A.*, et al.* (2008). A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. Genes Dev *22*, 2048-2061.
Schraufstatter, I.U., Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B., Spragg, R.G., Sklar, L.A., and Cochrane, C.G. (1986). Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences *83*, 4908-4912.
Schreiber, V., Ame, J.C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. J Biol Chem *277*, 23028-23036.
Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. Nat Rev Mol Cell Biol *7*, 517-528.
Schultz, N., Lopez, E., Saleh-Gohari, N., and Helleday, T. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. Nucleic Acids Research *31*, 4959-4964.
Scott, L.J. (2017). Niraparib: First Global Approval. Drugs *77*, 1029-1034.
Seibold, P., Schmezer, P., Behrens, S., Michailidou, K., Bolla, M.K., Wang, Q., Flesch-Janys, D., Nevanlinna, H., Fagerholm, R., Aittomäki, K.*, et al.* (2015). A polymorphism in the base excision repair gene PARP2 is associated with differential prognosis by chemotherapy among postmenopausal breast cancer patients. BMC Cancer *15*, 978.
Shahrour, M.A., Nicolae, C.M., Edvardson, S., Ashhab, M., Galvan, A.M., Constantin, D., Abu-Libdeh, B., Moldovan, G.L., and Elpeleg, O. (2016). PARP10 deficiency manifests by severe developmental delay and DNA repair defect. Neurogenetics *17*, 227-232.
Shao, Z., Davis, A.J., Fattah, K.R., So, S., Sun, J., Lee, K.J., Harrison, L., Yang, J., and Chen, D.J. (2012). Persistently bound Ku at DNA ends attenuates DNA end resection and homologous recombination. DNA Repair (Amst) *11*, 310-316.

Sharifi, R., Morra, R., Denise Appel, C., Tallis, M., Chioza, B., Jankevicius, G., Simpson, M.A., Matic, I., Ozkan, E., Golia, B.*, et al.* (2013). Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. The EMBO Journal *32*, 1225.
Sharma, S., Javadekar, S.M., Pandey, M., Srivastava, M., Kumari, R., and Raghavan, S.C. (2015). Homology and enzymatic requirements of microhomology-dependent alternative end joining. Cell Death Dis *6*, e1697.
Sharples, G.J., and Leach, D.R. (1995). Structural and functional similarities between the SbcCD proteins of Escherichia coli and the RAD50 and MRE11 (RAD32) recombination and repair proteins of yeast. Molecular microbiology *17*, 1215-1217.
Shea, T.B., Yabe, J.T., Ortiz, D., Pimenta, A., Loomis, P., Goldman, R.D., Amin, N., and Pant, H.C. (2004). Cdk5 regulates axonal transport and phosphorylation of neurofilaments in cultured neurons. Journal of cell science *117*, 933-941.
Shen, M.R., Zdzienicka, M.Z., Mohrenweiser, H., Thompson, L.H., and Thelen, M.P. (1998). Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA repair. Nucleic Acids Res *26*, 1032-1037.
Shepard, P.J., and Hertel, K.J. (2009). The SR protein family. Genome Biology *10*, 242.
Shi, T., Bunker, R.D., Mattarocci, S., Ribeyre, C., Faty, M., Gut, H., Scrima, A., Rass, U., Rubin, S.M., Shore, D.*, et al.* (2013). Rif1 and Rif2 shape telomere function and architecture through multivalent Rap1 interactions. Cell *153*, 1340-1353.
Shibata, A., Barton, O., Noon, A.T., Dahm, K., Deckbar, D., Goodarzi, A.A., Löbrich, M., and Jeggo, P.A. (2010). Role of ATM and the Damage Response Mediator Proteins 53BP1 and MDC1 in the Maintenance of G2/M Checkpoint Arrest. Molecular and Cellular Biology *30*, 3371-3383.
Shieh, W.M., Amé, J.-C., Wilson, M.V., Wang, Z.-Q., Koh, D.W., Jacobson, M.K., and Jacobson, E.L. (1998a). Poly (ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. Journal of Biological Chemistry *273*, 30069-30072.
Shim, E.Y., Chung, W.H., Nicolette, M.L., Zhang, Y., Davis, M., Zhu, Z., Paull, T.T., Ira, G., and Lee, S.E. (2010). Saccharomyces cerevisiae Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. Embo j *29*, 3370-3380.
Shiotani, B., and Zou, L. (2009). Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. Mol Cell *33*, 547-558.
Shupp, A., Casimiro, M.C., and Pestell, R.G. (2017). Biological functions of CDK5 and potential CDK5 targeted clinical treatments. Oncotarget *8*, 17373.
Sibanda, B.L., Chirgadze, D.Y., and Blundell, T.L. (2010). Crystal structure of DNA-PKcs reveals a large open-ring cradle comprised of HEAT repeats. Nature *463*, 118-121.
Simbulan-Rosenthal, C.M., Haddad, B.R., Rosenthal, D.S., Weaver, Z., Coleman, A., Luo, R., Young, H.M., Wang, Z.Q., Ried, T., and Smulson, M.E. (1999). Chromosomal aberrations in PARP(-/-) mice: genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 13191-13196.
Simsek, D., Brunet, E., Wong, S.Y., Katyal, S., Gao, Y., McKinnon, P.J., Lou, J., Zhang, L., Li, J., Rebar, E.J.*, et al.* (2011a). DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. PLoS genetics *7*, e1002080.
Simsek, D., Furda, A., Gao, Y., Artus, J., Brunet, E., Hadjantonakis, A.-K., Van Houten, B., Shuman, S., McKinnon, P.J., and Jasin, M. (2011b). Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. Nature *471*, 245-248.
Sizova, D.V., Keh, A., Taylor, B.F., and Sweasy, J.B. (2015). The R280H X-ray cross-complementing 1 germline variant induces genomic instability and cellular transformation. DNA Repair (Amst) *31*, 73-79.

Slade, D., Dunstan, M.S., Barkauskaite, E., Weston, R., Lafite, P., Dixon, N., Ahel, M., Leys, D., and Ahel, I. (2011). The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Nature *477*, 616-620.
Sleeth, K.M., Robson, R.L., and Dianov, G.L. (2004). Exchangeability of Mammalian DNA Ligases between Base Excision Repair Pathways. Biochemistry *43*, 12924-12930.
Slupphaug, G., Mol, C.D., Kavli, B., Arvai, A.S., Krokan, H.E., and Tainer, J.A. (1996). A nucleotide-flipping mechanism from the structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA. Nature *384*, 87-92.
Smeenk, G., Wiegant, W.W., Marteijn, J.A., Luijsterburg, M.S., Sroczynski, N., Costelloe, T., Romeijn, R.J., Pastink, A., Mailand, N., Vermeulen, W.*, et al.* (2013). Poly(ADP-ribosyl)ation links the chromatin remodeler SMARCA5/SNF2H to RNF168-dependent DNA damage signaling. Journal of cell science *126*, 889-903.
Smith, S., and de Lange, T. (2000). Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. Current biology : CB *10*, 1299-1302.
Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., and De Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. Science *282*, 1484-1487.
So, A., Le Guen, T., Lopez, B.S., and Guirouilh-Barbat, J. (2017). Genomic rearrangements induced by unscheduled DNA double strand breaks in somatic mammalian cells. The FEBS journal, n/a-n/a.
Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D.R., Culhane, A.C., Moreau, L.A., Xia, B., Livingston, D.M., and Greenberg, R.A. (2007). RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. Science *316*, 1198-1202.
Soni, A., Siemann, M., Grabos, M., Murmann, T., Pantelias, G.E., and Iliakis, G. (2014). Requirement for Parp-1 and DNA ligases 1 or 3 but not of Xrcc1 in chromosomal translocation formation by backup end joining. Nucleic acids research.
Sonoda, E., Sasaki, M.S., Buerstedde, J.M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Takeda, S. (1998). Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. The EMBO Journal *17*, 598.
Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., and De Villartay, J. (2007). V (D) J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. Oncogene *26*, 7780-7791.
Soutoglou, E., and Misteli, T. (2008). Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. Science *320*, 1507-1510.
Spagnolo, L., Rivera-Calzada, A., Pearl, L.H., and Llorca, O. (2006). Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. Mol Cell *22*, 511-519.
Stansel, R.M., de Lange, T., and Griffith, J.D. (2001). T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. Embo j *20*, 5532-5540.
Starita, L.M., and Parvin, J.D. (2003). The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. Current Opinion in Cell Biology *15*, 345-350.
Stark, J.M., Pierce, A.J., Oh, J., Pastink, A., and Jasin, M. (2004a). Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. Mol Cell Biol *24*, 9305-9316.
Stavnezer, J., Guikema, J.E., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. Annual review of immunology *26*, 261-292.
Stecklein, S.R., Kumaraswamy, E., Behbod, F., Wang, W., Chaguturu, V., Harlan-Williams, L.M., and Jensen, R.A. (2012). BRCA1 and HSP90 cooperate in homologous and non-homologous DNA double-strand-break repair and G2/M checkpoint activation. Proc Natl Acad Sci U S A *109*, 13650-13655.
Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. Cancer research *64*, 2390-2396.

Strande, N.T., Carvajal-Garcia, J., Hallett, R.A., Waters, C.A., Roberts, S.A., Strom, C., Kuhlman, B., and Ramsden, D.A. (2014). Requirements for 5'dRP/AP lyase activity in Ku. Nucleic Acids Res *42*, 11136-11143.
Strock, C.J., Park, J.I., Nakakura, E.K., Bova, G.S., Isaacs, J.T., Ball, D.W., and Nelkin, B.D. (2006). Cyclin-dependent kinase 5 activity controls cell motility and metastatic potential of prostate cancer cells. Cancer research *66*, 7509-7515.
Strom, C.E., Johansson, F., Uhlen, M., Szigyarto, C.A., Erixon, K., and Helleday, T. (2011). Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. Nucleic Acids Res *39*, 3166-3175.
Ström, C.E., Mortusewicz, O., Finch, D., Parsons, J.L., Lagerqvist, A., Johansson, F., Schultz, N., Erixon, K., Dianov, G.L., and Helleday, T. (2011). CK2 phosphorylation of XRCC1 facilitates dissociation from DNA and single-strand break formation during base excision repair. DNA Repair *10*, 961-969.
Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. Cell *123*, 1213-1226.
Sturzenegger, A., Burdova, K., Kanagaraj, R., Levikova, M., Pinto, C., Cejka, P., and Janscak, P. (2014). DNA2 Cooperates with the WRN and BLM RecQ Helicases to Mediate Long-range DNA End Resection in Human Cells. Journal of Biological Chemistry *289*, 27314-27326.
Sukhanova, M.V., Abrakhi, S., Joshi, V., Pastre, D., Kutuzov, M.M., Anarbaev, R.O., Curmi, P.A., Hamon, L., and Lavrik, O.I. (2016). Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosyl)ation using high-resolution AFM imaging. Nucleic Acids Research *44*, e60-e60.
Sun, B., Latham, K.A., Dodson, M.L., and Lloyd, R.S. (1995). Studies on the catalytic mechanism of five DNA glycosylases. Probing for enzyme-DNA imino intermediates. J Biol Chem *270*, 19501-19508.
Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstine, J.R., and Price, B.D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. Nat Cell Biol *11*, 1376-1382.
Suzuki, H., Uchida, K., Shima, H., Sato, T., Okamoto, T., Kimura, T., and Miwa, M. (1987). Molecular cloning of cDNA for human poly (ADP-ribose) polymerase and expression of its gene during HL-60 cell differentiation. Biochemical and biophysical research communications *146*, 403-409.
Sy, S.M., Huen, M.S., and Chen, J. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 7155-7160.
Syed, Y.Y. (2017). Rucaparib: First Global Approval. Drugs *77*, 585-592.
Syeda, A.H., Hawkins, M., and McGlynn, P. (2014). Recombination and replication. Cold Spring Harbor perspectives in biology *6*, a016550.
Symington, L.S. (2014). End Resection at Double-Strand Breaks: Mechanism and Regulation. Cold Spring Harbor perspectives in biology *6*.
Symington, L.S. (2016). Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. Crit Rev Biochem Mol Biol *51*, 195-212.
Symington, L.S., Rothstein, R., and Lisby, M. (2014). Mechanisms and regulation of mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *198*, 795-835.
Szántó, M., Brunyánszki, A., Márton, J., Vámosi, G., Nagy, L., Fodor, T., Kiss, B., Virág, L., Gergely, P., and Bai, P. (2014). Deletion of PARP-2 induces hepatic cholesterol accumulation and decrease in HDL levels. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease *1842*, 594-602.
Szántó, M., Rutkai, I., Hegedűs, C., Czikora, Á., Rózsahegyi, M., Kiss, B., Virág, L., Gergely, P., Tóth, A., and Bai, P. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction. Cardiovascular Research *92*, 430-438.

Tadi, S.K., Sebastian, R., Dahal, S., Babu, R.K., Choudhary, B., and Raghavan, S.C. (2016a). Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions. Molecular biology of the cell *27*, 223-235.
Tadi, Satish K., Tellier-Lebègue, C., Nemoz, C., Drevet, P., Audebert, S., Roy, S., Meek, K., Charbonnier, J.-B., and Modesti, M. (2016b). PAXX Is an Accessory c-NHEJ Factor that Associates with Ku70 and Has Overlapping Functions with XLF. Cell Reports *17*, 541-555.
Takanami, T., Nakamura, J., Kubota, Y., and Horiuchi, S. (2005). The Arg280His polymorphism in X-ray repair cross-complementing gene 1 impairs DNA repair ability. Mutation research *582*, 135-145.
Takashima, H., Boerkoel, C.F., John, J., Saifi, G.M., Salih, M.A., Armstrong, D., Mao, Y., Quiocho, F.A., Roa, B.B., Nakagawa, M.*, et al.* (2002). Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. Nature genetics *32*, 267-272.
Talhaoui, I., Lebedeva, N.A., Zarkovic, G., Saint-Pierre, C., Kutuzov, M.M., Sukhanova, M.V., Matkarimov, B.T., Gasparutto, D., Saparbaev, M.K., Lavrik, O.I.*, et al.* (2016). Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments in vitro. Nucleic Acids Research *44*, 9279-9295.
Tanaka, M., Miwa, M., Hayashi, K., Kubota, K., Matsushima, T., and Sugimura, T. (1977). Separation of oligo (adenosine diphosphate ribose) fractions with various chain lengths and terminal structures. Biochemistry *16*, 1485-1489.
Tannous, E., Kanaya, E., and Kanaya, S. (2015). Role of RNase H1 in DNA repair: removal of single ribonucleotide misincorporated into DNA in collaboration with RNase H2. *5*, 9969.
Tanny, J.C., Dowd, G.J., Huang, J., Hilz, H., and Moazed, D. (1999). An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing. Cell *99*, 735-745.
Tao, Z., Gao, P., Hoffman, D.W., and Liu, H.-w. (2008). Domain C of Human Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 Is Important for Enzyme Activity and Contains a Novel Zinc-Ribbon Motif†. Biochemistry *47*, 5804-5813.
Tashiro, S., Walter, J., Shinohara, A., Kamada, N., and Cremer, T. (2000). Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. J Cell Biol *150*, 283-291.
Taty-Taty, G.C., Chailleux, C., Quaranta, M., So, A., Guirouilh-Barbat, J., Lopez, B.S., Bertrand, P., Trouche, D., and Canitrot, Y. (2016). Control of alternative end joining by the chromatin remodeler p400 ATPase. Nucleic Acids Res *44*, 1657-1668.
Taylor, R.M., Moore, D.J., Whitehouse, J., Johnson, P., and Caldecott, K.W. (2000). A cell cycle-specific requirement for the XRCC1 BRCT II domain during mammalian DNA strand break repair. Molecular and cellular biology *20*, 735-740.
Taylor, R.M., Thistlethwaite, A., and Caldecott, K.W. (2002). Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. Mol Cell Biol *22*, 2556-2563.
Taylor, R.M., Wickstead, B., Cronin, S., and Caldecott, K.W. (1998). Role of a BRCT domain in the interaction of DNA ligase III-alpha with the DNA repair protein XRCC1. Current biology : CB *8*, 877-880.
Tebbs, R.S., Flannery, M.L., Meneses, J.J., Hartmann, A., Tucker, J.D., Thompson, L.H., Cleaver, J.E., and Pedersen, R.A. (1999). Requirement for theXrcc1DNA Base Excision Repair Gene during Early Mouse Development. Developmental biology *208*, 513-529.
Tebbs, R.S., Thompson, L.H., and Cleaver, J.E. (2003). Rescue of Xrcc1 knockout mouse embryo lethality by transgene-complementation. DNA repair *2*, 1405-1417.
Telli, M.L., Timms, K.M., Reid, J., Hennessy, B., Mills, G.B., Jensen, K.C., Szallasi, Z., Barry, W.T., Winer, E.P., Tung, N.M.*, et al.* (2016). Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *22*, 3764-3773.
Teloni, F., and Altmeyer, M. (2016). Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose. Nucleic Acids Res *44*, 993-1006.

Ter Brugge, P., Kristel, P., van der Burg, E., Boon, U., de Maaker, M., Lips, E., Mulder, L., de Ruiter, J., Moutinho, C., Gevensleben, H.*, et al.* (2016). Mechanisms of Therapy Resistance in Patient-Derived Xenograft Models of BRCA1-Deficient Breast Cancer. Journal of the National Cancer Institute *108*.
Terada, M., Fujiki, H., Marks, P.A., and Sugimura, T. (1979). Induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells by nicotinamide and related compounds. Proceedings of the National Academy of Sciences *76*, 6411-6414.
Thompson, L.H., Brookman, K.W., Dillehay, L.E., Carrano, A.V., Mazrimas, J.A., Mooney, C.L., and Minkler, J.L. (1982). A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. Mutation research *95*, 427-440.
Thompson, L.H., Brookman, K.W., Jones, N.J., Allen, S.A., and Carrano, A.V. (1990). Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. Mol Cell Biol *10*, 6160-6171.
Thompson, L.H., Rubin, J.S., Cleaver, J.E., Whitmore, G.F., and Brookman, K. (1980). A screening method for isolating DNA repair-deficient mutants of CHO cells. Somatic cell genetics *6*, 391-405.
Tichy, E.D., Liang, L., Deng, L., Tischfield, J., Schwemberger, S., Babcock, G., and Stambrook, P.J. (2011). Mismatch and base excision repair proficiency in murine embryonic stem cells. DNA Repair *10*, 445-451.
Timinszky, G., Till, S., Hassa, P.O., Hothorn, M., Kustatscher, G., Nijmeijer, B., Colombelli, J., Altmeyer, M., Stelzer, E.H., Scheffzek, K.*, et al.* (2009a). A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation. Nat Struct Mol Biol *16*, 923-929.
Tkac, J., Xu, G., Adhikary, H., Young, J.T., Gallo, D., Escribano-Diaz, C., Krietsch, J., Orthwein, A., Munro, M., Sol, W.*, et al.* (2016). HELB Is a Feedback Inhibitor of DNA End Resection. Mol Cell *61*, 405-418.
Todorova, T., Bock, F.J., and Chang, P. (2014). PARP13 regulates cellular mRNA post-transcriptionally and functions as a pro-apoptotic factor by destabilizing TRAILR4 transcript. Nat Commun *5*, 5362.
Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Catherine Hardebeck, M., Ilcheva, M., Vanessa Camacho, C., Louise Harris, J., Porteus, M., Llorente, B., Khanna, K.K., and Burma, S. (2014). Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice. Nature Communications *5*, 3561.
Torres-Rosell, J., Sunjevaric, I., De Piccoli, G., Sacher, M., Eckert-Boulet, N., Reid, R., Jentsch, S., Rothstein, R., Aragon, L., and Lisby, M. (2007). The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. Nat Cell Biol *9*, 923-931.
Trucco, C., Oliver, F.J., de Murcia, G., and Ménissier-de Murcia, J. (1998). DNA repair defect in poly (ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. Nucleic acids research *26*, 2644-2649.
Trujillo, K.M., and Sung, P. (2001). DNA structure-specific nuclease activities in the Saccharomyces cerevisiae Rad50*Mre11 complex. J Biol Chem *276*, 35458-35464.
Truong, L.N., Li, Y., Shi, L.Z., Hwang, P.Y.-H., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M.W., and Wu, X. (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 7720-7725.
Tsubouchi, H., and Ogawa, H. (1998). A novel mre11 mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis. Mol Cell Biol *18*, 260-268.
Tsukamoto, Y., Mitsuoka, C., Terasawa, M., Ogawa, H., and Ogawa, T. (2005). Xrs2p regulates Mre11p translocation to the nucleus and plays a role in telomere elongation and meiotic recombination. Molecular biology of the cell *16*, 597-608.
Tudek, B. (2007). Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. Molecular aspects of medicine *28*, 258-275.
Tuimala, J., Szekely, G., Gundy, S., Hirvonen, A., and Norppa, H. (2002). Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. Carcinogenesis *23*, 1003-1008.
Tuncel, H., Tanaka, S., Oka, S., Nakai, S., Fukutomi, R., Okamoto, M., Ota, T., Kaneko, H., Tatsuka, M., and Shimamoto, F. (2012). PARP6, a mono(ADP-ribosyl) transferase and a negative regulator of cell

proliferation, is involved in colorectal cancer development. International journal of oncology *41*, 2079-2086.
Turner, J.M. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. Development (Cambridge, England) *134*, 1823-1831.
Turner, N.C., Lord, C.J., Iorns, E., Brough, R., Swift, S., Elliott, R., Rayter, S., Tutt, A.N., and Ashworth, A. (2008). A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. Embo j *27*, 1368-1377.
Uchida, K., Morita, T., Sato, T., Ogura, T., Yamashita, R., Noguchi, S., Suzuki, H., Nyunoya, H., Miwa, M., and Sugimura, T. (1987). Nucleotide sequence of a full-length cDNA for human fibroblast poly (ADP-ribose) polymerase. Biochemical and biophysical research communications *148*, 617-622.
UCHIDA, T., GILL, D.M., and Pappenheimer, A. (1971). Mutation in the structural gene for diphtheria toxin carried by temperate phage β. Nature *233*, 8-11.
Ueda, K., Oka, J., Narumiya, S., Miyakawa, N., and Hayaishi, O. (1972). Poly ADP-ribose glycohydrolase from rat liver nuclei, a novel enzyme degrading the polymer. Biochemical and biophysical research communications *46*, 516-523.
Uematsu, N., Weterings, E., Yano, K., Morotomi-Yano, K., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., Mari, P.O., van Gent, D.C., Chen, B.P., and Chen, D.J. (2007b). Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. J Cell Biol *177*, 219-229.
Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M., and Bonassi, S. (2013). gammaH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. Mutation research *753*, 24-40.
van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. Cell *92*, 401-413.
Vandekerckhove, J., Schering, B., Barmann, M., and Aktories, K. (1987). Clostridium perfringens iota toxin ADP-ribosylates skeletal muscle actin in Arg-177. FEBS letters *225*, 48-52.
Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science *324*, 1029-1033.
Venkitaraman, A.R. (2002a). Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. Cell *108*, 171-182.
Verheugd, P., Forst, A.H., Milke, L., Herzog, N., Feijs, K.L., Kremmer, E., Kleine, H., and Luscher, B. (2013). Regulation of NF-kappaB signalling by the mono-ADP-ribosyltransferase ARTD10. Nat Commun *4*, 1683.
Vidal, A.E., Boiteux, S., Hickson, I.D., and Radicella, J.P. (2001). XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. Embo j *20*, 6530-6539.
Vilar, E., and Gruber, S.B. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. Nature reviews Clinical oncology *7*, 153-162.
Vilenchik, M.M., and Knudson, A.G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 12871-12876.
Vivelo, C.A., and Leung, A.K. (2015). Proteomics approaches to identify mono-(ADP-ribosyl)ated and poly(ADP-ribosyl)ated proteins. Proteomics *15*, 203-217.
Vriend, L.E.M., Prakash, R., Chen, C.-C., Vanoli, F., Cavallo, F., Zhang, Y., Jasin, M., and Krawczyk, P.M. (2016). Distinct genetic control of homologous recombination repair of Cas9-induced double-strand breaks, nicks and paired nicks. Nucleic Acids Research *44*, 5204-5217.
Vyas, S., Matic, I., Uchima, L., Rood, J., Zaja, R., Hay, R.T., Ahel, I., and Chang, P. (2014). Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. Nature Communications *5*, 4426.
Wahlberg, E., Karlberg, T., Kouznetsova, E., Markova, N., Macchiarulo, A., Thorsell, A.G., Pol, E., Frostell, A., Ekblad, T., Oncu, D*., et al.* (2012). Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors. Nature biotechnology *30*, 283-288.

Walker, J.R., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2001a). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. Nature *412*, 607-614.
Walsh, C., Ogawa, S., Scoles, D., Narod, S., Koeffler, H.P., and Karlan, B. (2014). Characterization of high copy number amplifications in advanced papillary serous ovarian cancer. Cancer research *67*, 2002.
Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B.A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S.P., and Elledge, S.J. (2007). Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. Science *316*, 1194-1198.
Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B., and Elledge, S.J. (2002). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. Science *298*, 1435-1438.
Wang, D., Du, R., and Liu, S. (2017). Rad51 inhibition sensitizes breast cancer stem cells to PARP inhibitor in triple-negative breast cancer. Chinese Journal of Cancer *36*, 37.
Wang, D., Luo, M., and Kelley, M.R. (2004). Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. Molecular cancer therapeutics *3*, 679-686.
Wang, D., Xiang, D.B., Yang, X.Q., Chen, L.S., Li, M.X., Zhong, Z.Y., and Zhang, Y.S. (2009a). APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) *66*, 298-304.
Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., and Iliakis, G. (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. Cancer research *65*, 4020-4030.
Wang, H., Shi, L.Z., Wong, C.C., Han, X., Hwang, P.Y., Truong, L.N., Zhu, Q., Shao, Z., Chen, D.J., Berns, M.W.*, et al.* (2013a). The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair. PLoS genetics *9*, e1003277.
Wang, J., Aroumougame, A., Lobrich, M., Li, Y., Chen, D., Chen, J., and Gong, Z. (2014). PTIP associates with Artemis to dictate DNA repair pathway choice. Genes & Development *28*, 2693-2698.
Wang, J.H., Alt, F.W., Gostissa, M., Datta, A., Murphy, M., Alimzhanov, M.B., Coakley, K.M., Rajewsky, K., Manis, J.P., and Yan, C.T. (2008). Oncogenic transformation in the absence of Xrcc4 targets peripheral B cells that have undergone editing and switching. The Journal of Experimental Medicine *205*, 3079.
Wang, J.H., Gostissa, M., Yan, C.T., Goff, P., Hickernell, T., Hansen, E., Difilippantonio, S., Wesemann, D.R., Zarrin, A.A., Rajewsky, K.*, et al.* (2009b). Mechanisms promoting translocations in editing and switching peripheral B cells. Nature *460*, 231-236.
Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., and Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. Nucleic Acids Research *34*, 6170-6182.
Wang, P., Tang, J.T., Peng, Y.S., Chen, X.Y., Zhang, Y.J., and Fang, J.Y. (2010). XRCC1 downregulated through promoter hypermethylation is involved in human gastric carcinogenesis. Journal of digestive diseases *11*, 343-351.
Wang, S., Wu, X., Chen, Y., Zhang, J., Ding, J., Zhou, Y., He, S., Tan, Y., Qiang, F., Bai, J.*, et al.* (2012a). Prognostic and predictive role of JWA and XRCC1 expressions in gastric cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *18*, 2987-2996.
Wang, Y., Bernhardy, A.J., Cruz, C., Krais, J.J., Nacson, J., Nicolas, E., Peri, S., van der Gulden, H., van der Heijden, I., O'Brien, S.W.*, et al.* (2016a). The BRCA1-Delta11q Alternative Splice Isoform Bypasses Germline Mutations and Promotes Therapeutic Resistance to PARP Inhibition and Cisplatin. Cancer research *76*, 2778-2790.
Wang, Y., Krais, J.J., Bernhardy, A.J., Nicolas, E., Cai, K.Q., Harrell, M.I., Kim, H.H., George, E., Swisher, E.M., Simpkins, F.*, et al.* (2016b). RING domain-deficient BRCA1 promotes PARP inhibitor and platinum resistance. The Journal of clinical investigation *126*, 3145-3157.

Wang, Z., Michaud, G.A., Cheng, Z., Zhang, Y., Hinds, T.R., Fan, E., Cong, F., and Xu, W. (2012b). Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribosyl)ation-dependent ubiquitination. Genes Dev *26*, 235-240.
Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. Science *123*, 309-314.
Ward, I.M., Reina-San-Martin, B., Olaru, A., Minn, K., Tamada, K., Lau, J.S., Cascalho, M., Chen, L., Nussenzweig, A., Livak, F.*, et al.* (2004). 53BP1 is required for class switch recombination. The Journal of Cell Biology *165*, 459.
Watanabe, S., Watanabe, K., Akimov, V., Bartkova, J., Blagoev, B., Lukas, J., and Bartek, J. (2013). JMJD1C demethylates MDC1 to regulate the RNF8 and BRCA1–mediated chromatin response to DNA breaks. Nat Struct Mol Biol *20*, 1425-1433.
Weaver, A., and Yang, E. (2013). Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. Frontiers in Oncology *3*.
Wei, L., Lan, L., Hong, Z., Yasui, A., Ishioka, C., and Chiba, N. (2008). Rapid recruitment of BRCA1 to DNA double-strand breaks is dependent on its association with Ku80. Mol Cell Biol *28*, 7380-7393.
Wei, L., Nakajima, S., Hsieh, C.-L., Kanno, S., Masutani, M., Levine, A.S., Yasui, A., and Lan, L. (2013). Damage response of XRCC1 at sites of DNA single strand breaks is regulated by phosphorylation and ubiquitylation after degradation of poly(ADP-ribose). Journal of cell science *126*, 4414.
Weinstock, D.M., Brunet, E., and Jasin, M. (2007). Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. Nat Cell Biol *9*, 978-981.
Westhorpe, F.G., and Straight, A.F. (2013). Functions of the centromere and kinetochore in chromosome segregation. Curr Opin Cell Biol *25*, 334-340.
Weston, V.J., Oldreive, C.E., Skowronska, A., Oscier, D.G., Pratt, G., Dyer, M.J., Smith, G., Powell, J.E., Rudzki, Z., Kearns, P.*, et al.* (2010). The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. Blood *116*, 4578-4587.
White, D., Rafalska-Metcalf, I.U., Ivanov, A.V., Corsinotti, A., Peng, H., Lee, S.C., Trono, D., Janicki, S.M., and Rauscher, F.J., 3rd (2012). The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin: regulation by HP1 proteins and serine 473/824 phosphorylation. Molecular cancer research : MCR *10*, 401-414.
Whitehouse, C.J., Taylor, R.M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D.D., Weinfeld, M., and Caldecott, K.W. (2001). XRCC1 Stimulates Human Polynucleotide Kinase Activity at Damaged DNA Termini and Accelerates DNA Single-Strand Break Repair. Cell *104*, 107-117.
Wiederhold, L., Leppard, J.B., Kedar, P., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Weinfeld, M., Tomkinson, A.E., Izumi, T., Prasad, R., Wilson, S.H.*, et al.* (2004). AP Endonuclease-Independent DNA Base Excision Repair in Human Cells. Molecular Cell *15*, 209-220.
WIELCKENS, K., BREDEHORST, R., ADAMIETZ, P., and HILZ, H. (1981). Protein-Bound Polymeric and Monomeric ADP-Ribose Residues in Hepatic Tissues. European journal of biochemistry *117*, 69-74.
Williams, R.S., Dodson, G.E., Limbo, O., Yamada, Y., Williams, J.S., Guenther, G., Classen, S., Glover, J.N., Iwasaki, H., Russell, P.*, et al.* (2009). Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. Cell *139*, 87-99.
Williams, R.S., Moncalian, G., Williams, J.S., Yamada, Y., Limbo, O., Shin, D.S., Groocock, L.M., Cahill, D., Hitomi, C., Guenther, G.*, et al.* (2008). Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. Cell *135*, 97-109.
Wilson, M.D., Benlekbir, S., Fradet-Turcotte, A., Sherker, A., Julien, J.P., McEwan, A., Noordermeer, S.M., Sicheri, F., Rubinstein, J.L., and Durocher, D. (2016). The structural basis of modified nucleosome recognition by 53BP1. Nature *536*, 100-103.
Wilson, T.E., Grawunder, U., and Lieber, M.R. (1997). Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. Nature *388*, 495-498.

Wong, J.M., and Collins, K. (2003). Telomere maintenance and disease. Lancet (London, England) *362*, 983-988.
Woodrick, J., Gupta, S., Camacho, S., Parvathaneni, S., Choudhury, S., Cheema, A., Bai, Y., Khatkar, P., Erkizan, H.V., Sami, F.*, et al.* (2017). A new sub-pathway of long-patch base excision repair involving 5' gap formation. Embo j.
Wu, H., Sun, H., Liang, X., Lima, W.F., and Crooke, S.T. (2013). Human RNase H1 Is Associated with Protein P32 and Is Involved in Mitochondrial Pre-rRNA Processing. PloS one *8*, e71006.
Wu, X., Wilson, T.E., and Lieber, M.R. (1999). A role for FEN-1 in nonhomologous DNA end joining: the order of strand annealing and nucleolytic processing events. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 1303-1308.
Wyatt, D.W., Feng, W., Conlin, M.P., Yousefzadeh, M.J., Roberts, S.A., Mieczkowski, P., Wood, R.D., Gupta, G.P., and Ramsden, D.A. (2016). Essential Roles for Polymerase theta-Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks. Mol Cell *63*, 662-673.
Xanthoudakis, S., Smeyne, R.J., Wallace, J.D., and Curran, T. (1996a). The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 8919-8923.
Xiao, Y., and Weaver, D.T. (1997). Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. Nucleic Acids Res *25*, 2985-2991.
Xie, A., Kwok, A., and Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. Nat Struct Mol Biol *16*, 814-818.
Xie, J., Zhang, L., Li, M., Du, J., Zhou, L., Yang, S., Zeng, L., Li, Z., Wang, G., and Wang, D. (2014). Functional analysis of the involvement of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 in the resistance to melphalan in multiple myeloma. BMC cancer *14*, 11-11.
Xie, S., Mortusewicz, O., Ma, Hoi T., Herr, P., Poon, Randy Y.C., Helleday, T., and Qian, C. (2015). Timeless Interacts with PARP-1 to Promote Homologous Recombination Repair. Molecular Cell *60*, 163-176.
Xiong, X., Du, Z., Wang, Y., Feng, Z., Fan, P., Yan, C., Willers, H., and Zhang, J. (2015). 53BP1 promotes microhomology-mediated end-joining in G1-phase cells. Nucleic Acids Research *43*, 1659-1670.
Xu, G., Chapman, J.R., Brandsma, I., Yuan, J., Mistrik, M., Bouwman, P., Bartkova, J., Gogola, E., Warmerdam, D., Barazas, M.*, et al.* (2015). REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. Nature *521*, 541-544.
Xu, S., Bai, P., Little, P.J., and Liu, P. (2014a). Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 (PARP1) in Atherosclerosis: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Implications. Medicinal Research Reviews *34*, 644-675.
Xu, W., Wang, S., Chen, Q., Zhang, Y., Ni, P., Wu, X., Zhang, J., Qiang, F., Li, A., Roe, O.D.*, et al.* (2014b). TXNL1-XRCC1 pathway regulates cisplatin-induced cell death and contributes to resistance in human gastric cancer. Cell Death Dis *5*, e1055.
Xu, X., Aprelikova, O., Moens, P., Deng, C.X., and Furth, P.A. (2003). Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. Development (Cambridge, England) *130*, 2001-2012.
Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P.*, et al.* (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. Nature *449*, 478-482.
Yan, J., and Jetten, A.M. (2008). RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites. Cancer letters *271*, 179-190.
Yang, S.W., Burgin, A.B., Jr., Huizenga, B.N., Robertson, C.A., Yao, K.C., and Nash, H.A. (1996). A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 11534-11539.

Yang, W.M., Yao, Y.L., and Seto, E. (2001). The FK506-binding protein 25 functionally associates with histone deacetylases and with transcription factor YY1. Embo j *20*, 4814-4825.
Yang, Y.G., Cortes, U., Patnaik, S., Jasin, M., and Wang, Z.Q. (2004). Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. Oncogene *23*, 3872-3882.
Yano, K., Morotomi-Yano, K., Wang, S.Y., Uematsu, N., Lee, K.J., Asaithamby, A., Weterings, E., and Chen, D.J. (2008). Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks. EMBO Rep *9*, 91-96.
Yazinski, S.A., Comaills, V., Buisson, R., Genois, M.M., Nguyen, H.D., Ho, C.K., Todorova Kwan, T., Morris, R., Lauffer, S., Nussenzweig, A.*, et al.* (2017). ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant BRCA-deficient cancer cells. Genes Dev *31*, 318-332.
Yelamos, J., Monreal, Y., Saenz, L., Aguado, E., Schreiber, V., Mota, R., Fuente, T., Minguela, A., Parrilla, P., de Murcia, G.*, et al.* (2006). PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes. EMBO J *25*, 4350-4360.
Yen, P.H., Li, X.M., Tsai, S.P., Johnson, C., Mohandas, T., and Shapiro, L.J. (1990). Frequent deletions of the human X chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. Cell *61*, 603-610.
Ying, S., Chen, Z., Medhurst, A.L., Neal, J.A., Bao, Z., Mortusewicz, O., McGouran, J., Song, X., Shen, H., Hamdy, F.C.*, et al.* (2016). DNA-PKcs and PARP1 Bind to Unresected Stalled DNA Replication Forks Where They Recruit XRCC1 to Mediate Repair. Cancer research *76*, 1078-1088.
Ying, S., Hamdy, F.C., and Helleday, T. (2012). Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. Cancer research *72*, 2814-2821.
Yu, A.M., and McVey, M. (2010). Synthesis-dependent microhomology-mediated end joining accounts for multiple types of repair junctions. Nucleic Acids Res *38*, 5706-5717.
Yu, M., Schreek, S., Cerni, C., Schamberger, C., Lesniewicz, K., Poreba, E., Vervoorts, J., Walsemann, G., Grotzinger, J., Kremmer, E.*, et al.* (2005). PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation. Oncogene *24*, 1982-1993.
Yu, S.-W., Andrabi, S.A., Wang, H., Kim, N.S., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2006). Apoptosis-inducing factor mediates poly (ADP-ribose)(PAR) polymer-induced cell death. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 18314-18319.
Yu, X., and Chen, J. (2004). DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. Mol Cell Biol *24*, 9478-9486.
Yu, X., Chini, C.C., He, M., Mer, G., and Chen, J. (2003). The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. Science *302*, 639-642.
Yu, X., and Gabriel, A. (2003b). Ku-dependent and Ku-independent end-joining pathways lead to chromosomal rearrangements during double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *163*, 843-856.
Yuen, L.K., Zubaidah, Z., Ni, I.B.P., Noor, M.B.P.J., Ezalia, E., Meng, C.Y., Chuan, O.T., Subramanian, V., and Meng, C.K. (2014). High-Resolution Analysis of Chromosomal Alterations in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Journal of Hematology; Vol 3, No 3, Sept 2014.
Yun, M.H., and Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. Nature *459*, 460-463.
Zahradka, P., and Ebisuzaki, K. (1982). A Shuttle Mechanism for DNA-Protein Interactions. European Journal of Biochemistry *127*, 579-585.
Zakharyevich, K., Ma, Y., Tang, S., Hwang, P.Y., Boiteux, S., and Hunter, N. (2010). Temporally and biochemically distinct activities of Exo1 during meiosis: double-strand break resection and resolution of double Holliday junctions. Mol Cell *40*, 1001-1015.

Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., and Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. The Journal of Cell Biology *208*, 563-579.
Zgheib, O., Pataky, K., Brugger, J., and Halazonetis, T.D. (2009). An oligomerized 53BP1 tudor domain suffices for recognition of DNA double-strand breaks. Mol Cell Biol *29*, 1050-1058.
Zhang, F., Chen, Y., Li, M., and Yu, X. (2014). The oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold motif is a poly(ADP-ribose)-binding domain that mediates DNA damage response. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, 7278-7283.
Zhang, F., Fan, Q., Ren, K., and Andreassen, P.R. (2009a). PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. Molecular cancer research : MCR *7*, 1110-1118.
Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., and Yu, X. (2009b). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. Current biology : CB *19*, 524-529.
Zhang, F., Shi, J., Bian, C., and Yu, X. (2015a). Poly(ADP-Ribose) Mediates the BRCA2-Dependent Early DNA Damage Response. Cell Reports *13*, 678-689.
Zhang, F., Shi, J., Chen, S.-H., Bian, C., and Yu, X. (2015b). The PIN domain of EXO1 recognizes poly(ADP-ribose) in DNA damage response. Nucleic Acids Research *43*, 10782-10794.
Zhang, H., Liu, H., Chen, Y., Yang, X., Wang, P., Liu, T., Deng, M., Qin, B., Correia, C., Lee, S*., et al.* (2016). A cell cycle-dependent BRCA1–UHRF1 cascade regulates DNA double-strand break repair pathway choice. Nature Communications *7*, 10201.
Zhang, K., Zhou, B., Wang, Y., Rao, L., and Zhang, L. (2012). The XRCC1 Arg280His polymorphism contributes to cancer susceptibility: an update by meta-analysis of 53 individual studies. Gene *510*, 93-101.
Zhang, R., Niu, Y., and Zhou, Y. (2010). Increase the cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA damage in HepG2 cells by XRCC1 abrogation related mechanisms. Toxicology letters *192*, 108-114.
Zhang, X., Morera, S., Bates, P.A., Whitehead, P.C., Coffer, A.I., Hainbucher, K., Nash, R.A., Sternberg, M.J., Lindahl, T., and Freemont, P.S. (1998). Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module. EMBO J *17*, 6404-6411.
Zhang, Y., Dong, S., Xu, R., Yang, Y., Zheng, Z., Wang, X., Ren, R., Sun, R., Li, M., Yang, H*., et al.* (2017). Prognostic and predictive role of COX-2, XRCC1 and RASSF1 expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma receiving radiotherapy. Oncology letters *13*, 2549-2556.
Zhang, Y., and Jasin, M. (2011). An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. Nat Struct Mol Biol *18*, 80-84.
Zhang, Y., Wang, J., Ding, M., and Yu, Y. (2013a). Site-specific characterization of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome. Nat Meth *10*, 981-984.
Zhang, Y., Wang, M., Gu, D., Wu, D., Zhang, X., Gong, W., Tan, Y., Zhou, J., Wu, X., and Tang, C. (2013c). Association of XRCC1 gene polymorphisms with the survival and clinicopathological characteristics of gastric cancer. DNA and cell biology *32*, 111-118.
Zhang, Z., Zhu, L., Lin, D., Chen, F., Chen, D.J., and Chen, Y. (2001). The three-dimensional structure of the C-terminal DNA-binding domain of human Ku70. J Biol Chem *276*, 38231-38236.
Zhong, Q., Chen, C.F., Chen, P.L., and Lee, W.H. (2002). BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks. J Biol Chem *277*, 28641-28647.
Zhou, X., Gu, L., Zeng, Y., Wei, L., Ying, M., Wang, N., Su, C., Wang, Y., and Liu, C. (2014a). The XRCC1 Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in head and neck cancer susceptibility: a meta-analysis. Tumor Biology *35*, 10665-10676.
Zhou, Y., and Paull, T.T. (2013). DNA-dependent Protein Kinase regulates DNA end resection in concert with the Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex and Ataxia-Telangiectasia-Mutated (ATM). Journal of Biological Chemistry.

Zhou, Y., Zhou, W., Liu, Q., Fan, Z., Yang, Z., Tu, Q., Li, L., and Liu, H. (2014b). XRCC1 R399Q polymorphism and risk of normal tissue injury after radiotherapy in breast cancer patients. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine *35*, 21-25.
Zhu, J., Petersen, S., Tessarollo, L., and Nussenzweig, A. (2001). Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. Current biology : CB *11*, 105-109.
Zhu, Y., Chen, G., Lv, F., Wang, X., Ji, X., Xu, Y., Sun, J., Wu, L., Zheng, Y.T., and Gao, G. (2011). Zinc-finger antiviral protein inhibits HIV-1 infection by selectively targeting multiply spliced viral mRNAs for degradation. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 15834-15839.
Zhu, Z., Chung, W.H., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. Cell *134*, 981-994.
Zhuang, J., Jiang, G., Willers, H., and Xia, F. (2009). Exonuclease function of human Mre11 promotes deletional nonhomologous end joining. J Biol Chem *284*, 30565-30573.
Zimmermann, M., Lottersberger, F., Buonomo, S.B., Sfeir, A., and de Lange, T. (2013). 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. Science *339*, 700-704.
Zolner, A.E., Abdou, I., Ye, R., Mani, R.S., Fanta, M., Yu, Y., Douglas, P., Tahbaz, N., Fang, S., Dobbs, T.*, et al.* (2011). Phosphorylation of polynucleotide kinase/ phosphatase by DNA-dependent protein kinase and ataxia-telangiectasia mutated regulates its association with sites of DNA damage. Nucleic Acids Res *39*, 9224-9237.
Zong, D., Callén, E., Pegoraro, G., Lukas, C., Lukas, J., and Nussenzweig, A. (2015). Ectopic expression of RNF168 and 53BP1 increases mutagenic but not physiological non-homologous end joining. Nucleic Acids Research *43*, 4950-4961.
Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science *300*, 1542-1548.
Zou, Y., Liu, Y., Wu, X., and Shell, S.M. (2006). Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. Journal of cellular physiology *208*, 267-273.

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Cancérologie, biologie, médecine, santé (CBMS)

Fonctions et régulations de PARP2 et de XRCC1 dans la réparation des dommages à l'ADN

Mots clés : PARP, XRCC1, Cassures double-brins, Résection, Recombinaison homologue, ADP-ribose

Les modifications post-traductionnelles des protéines par des polymères d'ADP-ribose (PAR) ou par phosphorylation permet l'assemblage des complexes de la réparation de l'ADN à la chromatine endommagée dont les fonctions sont essentielles pour assurer le maintien de la stabilité du génome. En réponse aux lésions de l'ADN, l'activité de synthèse de PAR des protéines PARP1 et PARP2 est fortement stimulée. Les PAR servent de signalisation pour le recrutement de multiples protéines, dont la protéine plateforme XRCC1.

Les études menées au cours de cette thèse ont porté sur l'étude de la régulation des fonctions des protéines PARP1, PARP2 dans la réparation des cassures double brins (CDB) et l'étude des modifications de XRCC1 par phosphorylation en réponse à des dommages de l'ADN. En utilisant des substrats permettant de mesurer l'efficacité des différentes voies de réparation des CDB, nous avons démontré que PARP2, et non PARP1, est impliqué dans la régulation du choix des voies de la réparation des CDB. Plus spécifiquement, nous avons montré que PARP2 stimule l'initiation de la résection des extrémités des CDB dépendante de CtIP, indépendamment de son activité catalytique. Par des approches de vidéo-microscopie, nous avons pu déterminer que PARP2 limite l'accumulation de 53BP1 aux sites de dommages induits par micro-irradiation laser. Nous proposons que la protéine PARP2, en limitant le recrutement de la protéine 53BP1 aux sites de dommages, favorise la réparation des CDB dépendante de la résection des extrémités d'ADN, au détriment de la voie canonique de jonction des extrémités. Ces résultats sont les premiers démontrant un rôle de PARP2 dans le choix des voies de réparation des CDB.

En parallèle, nous avons analysé comment la phosphorylation régule les fonctions de la protéine XRCC1. Par des approches *in vitro* et *in vivo*, nous avons pu déterminer que l'interdomaine 1 de XRCC1 est phosphorylé par la kinase CDK5. En réponse aux dommages induits par un agent alkylant, XRCC1 est activement déphosphorylé *in vivo*. De plus, nous avons observé que lorsque l'interdomaine 1 ne peut pas être phosphorylé *in vitro*, l'interaction de XRCC1 avec les PAR synthétisés par PARP1 et PARP2 augmente, et le recrutement de XRCC1 aux sites de dommages de l'ADN est accru. Ces résultats indiquent pour la première fois que la déphosphorylation de XRCC1 en réponse à un stress génotoxique participe activement à son recrutement aux sites de dommages.

Dans leur ensemble, ces travaux ont contribué à améliorer nos connaissances fondamentales des réseaux de protéines impliquées dans la prise en charge des dommages de l'ADN. La compréhension de ces mécanismes est essentielle non seulement car ils participent au maintien de la stabilité du génome mais aussi du fait du développement exponentiel de nouvelles stratégies anti-tumorales qui visent à inhiber les voies de la réparation dans la but de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses.

Functions and regulations of PARP2 and XRCC1 in DNA repair

Keywords : PARP, XRCC1, Double-strand breaks, Resection, Homologous recombination, ADP-ribose

Post-translational modifications of proteins by polymers of ADP-ribose (PAR) or by phosphorylation allow the assembly of DNA repair protein complexes at damaged chromatin and are crucial to ensure genome stability. In response to DNA insults, the synthesis of PAR by the PARP1 and PARP2 proteins is strongly induced. PAR act as a signaling platform for the recruitment of multiples proteins at the sites of DNA damages, including the scaffold protein XRCC1. Research conducted during this PhD have been focused on studying the regulation of PARP1 and PARP2 functions in double-strands break repair (DSBR), and in investigating the role of XRCC1 modifications by phosphorylation in response to DNA damage.

Using DNA repair assay allowing us to assess the accuracy of the different DSBR pathways, we demonstrated that PARP2, and not PARP1, is involved in the regulation of DNA double-strands break repair pathway choice. More precisely, we showed that PARP2 stimulates CtIP dependent initiation of end-resection at DSB, independently of its catalytic activity. By live cell imaging, we were able to determine that PARP2 limit 53BP1 accumulation at DNA damage sites induced by laser-microirradiation. We propose that by limiting 53BP1 accumulation at DNA damage sites, PARP2 stimulate DSB repair pathway that depend on DNA end-resection, thus counteracting the canonical end-joining pathway. These results are the first demonstrating a role for PARP2 in DNA DBSR pathway choice.

In addition, we analyzed how the functions of XRCC1 are regulated by phosphorylation. Using *in vitro* and *in vivo* approaches, we were able to demonstrate that the linker 1 region of XRCC1 is phosphorylated by the CDK5 kinase. XRCC1 is actively dephosphorylated in response to DNA damage induced by an alkylating agent *in vivo*. We also observed that when the linker 1 cannot be phosphorylated, the XRCC1 interaction between the PAR synthetized by PARP1 and PARP2 is stimulated, and XRCC1 recruitement at the sites of DNA damage is far more efficient. These evidences indicate for the first time that the dephosphorylation of XRCC1 actively participate in its recruitment at the site of DNA damage. Put together, this work contributed to strengthen our fundamental knowledge of the protein network involved in the DNA damage response. Knowledge of those mechanisms is crucial since they participate in maintaining genome stability, and because new antitumoral drugs targeting DNA repair pathways in the attempt to specifically killed tumor cells are exponentially released.

institutCurie
FONDATION ARC POUR LA RECHERCHE SUR LE CANCER
Reconnue d'utilité publique