



HAL
open science

Etude fonctionnelle de mutants de DCLRE1B/Apollo dans l'oncogenèse rénale

Charlie Bories

► **To cite this version:**

Charlie Bories. Etude fonctionnelle de mutants de DCLRE1B/Apollo dans l'oncogenèse rénale. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL115 . tel-04812770

HAL Id: tel-04812770

<https://theses.hal.science/tel-04812770v1>

Submitted on 1 Dec 2024

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.

Etude fonctionnelle de mutants de *DCLRE1B/Apollo* dans l'oncogenèse rénale

Functional study of DCLRE1B/Apollo mutants in renal oncogenesis

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire
Graduate School : Sciences de la vie et santé. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche
Intégrité du génome et cancer
(Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, CNRS),
sous la direction de **Flore RENAUD**, Maître de Conférences

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 29 novembre 2023, par

Charlie BORIES

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Eric GILSON

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier,
Université Côte d'Azur

Président

Betty GARDIE

Directrice d'Etudes, Université PSL

Rapporteuse & Examinatrice

Christophe LACHAUD

Chargé de Recherche, HDR, Aix-Marseille
Université

Rapporteur & Examineur

Laurence ALBIGES

Professeure des Universités - Praticienne
Hospitalière, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Titre : Etude fonctionnelle de mutants de *DCLRE1B/Apollo* dans l'oncogenèse rénale

Mots clés : *DCLRE1B/Apollo*, cancer du rein, dommages de l'ADN, télomères, oncogenèse

Résumé : Environ 15000 nouveaux cas de cancers du rein (Renal Cell Carcinoma, RCC) sont recensés par an en France. Les RCC héréditaires représentent seulement 3-5% de l'ensemble des cas, néanmoins, les gènes de prédisposition associés aux cas héréditaires appartiennent aux mêmes processus cellulaires que ceux dérégulés dans les RCC sporadiques, c'est-à-dire non héréditaires. Ainsi, l'identification et la caractérisation fonctionnelle des gènes de prédisposition au RCC constitue un enjeu majeur pour la compréhension des mécanismes de l'oncogenèse rénale.

La recherche de nouveaux gènes potentiels de prédisposition au RCC a conduit notre équipe à l'identification de deux variants constitutifs dans le gène *DCLRE1B/Apollo* chez plusieurs patients de deux familles atteintes de RCC héréditaires. Mon projet de thèse a consisté à caractériser les activités d'*Apollo* dans un modèle de cellules épithéliales rénales humaines ainsi que l'impact des variants

identifiés sur ses activités.

En utilisant différentes stratégies de modification de l'expression génique, nous avons montré qu'*Apollo* est impliqué dans les voies de réponse aux dommages de type liaisons interbrins et cassures double-brins de l'ADN dans la lignée rénale humaine HKC8. Nous avons également montré qu'*Apollo* participe au maintien de l'intégrité des télomères dans la lignée HKC8 et que cette fonction est inhibée par les mutations identifiées chez les patients. Finalement, la caractérisation des mécanismes moléculaires sous-jacents aux différents rôles d'*Apollo* semblent indiquer l'existence d'interactions fonctionnelles avec plusieurs gènes associés à l'oncogenèse.

Notre étude montre pour la première fois les fonctions d'*Apollo* dans un modèle de cellules épithéliales rénales humaines et suggère que des mutations d'*Apollo* peuvent induire une instabilité génomique favorable à l'oncogenèse rénale.

Title: Functional study of *DCLRE1B/Apollo* mutants in the renal oncogenesis

Keywords: *DCLRE1B/Apollo*, kidney cancer, DNA damages, telomeres, oncogenesis

Abstract: Kidney cancers (Renal Cell Carcinoma, RCC) account for around 15000 new cases per year in France. Inherited RCC account for only 3-5% of all RCC, however, the RCC-associated genes belong to the same cellular pathways as those dysregulated in sporadic (non-hereditary) cancers. Consequently, the identification and functional characterization of the RCC-associated genes is a major challenge to gain further insight into the mechanisms driving renal oncogenesis.

The search for new potential RCC-associated genes led our team to the identification of two germline variants in the *DCLRE1B/Apollo* gene in patients from two families suffering from hereditary RCC. The goal of my thesis project was to characterize *Apollo's* activities in a human epithelial renal cell model and

the impact of the identified variants on its activities. Using different strategies to modify genetic expression, we showed that *Apollo* plays a role in the DNA damage response to DNA interstrand crosslinks and double-strand breaks in the HKC8 human renal cell line. We also showed that *Apollo* is involved in the telomere maintenance in HKC8 cells and that both mutations identified in patients inhibit this function. Finally, the characterization of the molecular mechanisms underlying *Apollo's* activities suggests the existence of functional interactions with genes known to be associated with oncogenesis.

Our study demonstrates for the first time *Apollo's* activities in a human renal cell model and suggests that *Apollo's* mutations could lead to genomic instability favoring renal oncogenesis.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dr Betty Gardie et Dr Christophe Lachaud pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse ainsi que Pr Laurence Albiges et Pr Eric Gilson pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci Flore de m'avoir choisi comme doctorant et de m'avoir fait confiance dans la conduite de ce projet. J'ai énormément appris à tes côtés, tant sur le plan scientifique que personnel. Merci pour ton soutien, tes conseils et ta bienveillance. Merci surtout de m'avoir montré qu'avec un peu d'optimisme et pas mal de persévérance, les sujets de recherche les plus compliqués deviennent les plus stimulants.

Je souhaite également remercier Dr Patrick Revy et Laëtitia Kermasson pour leur aide inestimable dans la réalisation de ce projet. Merci à tous les deux d'avoir toujours pris le temps de m'aider et de me conseiller malgré vos propres contraintes. Je vous en suis très reconnaissant.

Merci pour tout, Thomas. Tu as été un stagiaire exceptionnel, le meilleur que je pouvais espérer, et je ne doute pas un seul instant que tu seras un excellent doctorant. Merci pour tous les moments passés ensemble, pour nos conversations et nos séances d'escalade. Je suis très heureux que la thèse m'ait permis de construire une si belle amitié.

Durant ces quatre années, j'ai eu la chance de travailler au sein d'un groupe de recherche formidable et cet environnement a réellement fait la différence, particulièrement dans les moments difficiles. Merci donc à Sophie G et Sophie C pour tout ce que vous avez pu m'apporter durant cette thèse. Sophie G, merci pour ta gentillesse, ton écoute et tout le temps que tu consacres à faire vivre et avancer le groupe. Sophie C, merci pour ta bonne humeur, ton humour et pour toutes les discussions professionnelles et personnelles enrichissantes. Merci également Kevin pour ton professionnalisme et ta gentillesse, c'est très agréable de travailler avec toi. Merci à Sophie F et Stéphane qui sont la fondation clinique sans laquelle nos projets de recherche n'existeraient pas.

J'aimerais également remercier tous les membres anciens et actuels de mon équipe de recherche. En particulier, merci à Murat, Sacha, Regina et Dominique pour les discussions scientifiques stimulantes. Merci à mon ancienne co-doctorante, Umit, et mon actuelle co-doctorante, Maëva, avec qui j'ai pu partager les frustrations de la thèse et que j'apprécie beaucoup. Enfin, merci à notre ancien stagiaire, Olivier, que j'apprécie également beaucoup et que j'espère revoir bientôt.

Je remercie tous les membres de l'unité de recherche U9019 qui ont pu contribuer de près ou de loin à la réalisation de cette thèse. Je remercie particulièrement Morwenna, Caroline, Frédérique et Chloé qui consacrent beaucoup de temps et d'énergie à la gestion des consommables et des technologies de l'unité. Merci à notre DU, Patricia Kannouche, et notre gestionnaire, Christelle Bouchot, de faire tout leur possible pour faire fonctionner et avancer cette unité depuis de nombreuses années. Merci également à tou.te.s les doctorant.e.s, post-docs, ingénieur.e.s, technicien.ne.s de cette unité avec qui j'ai toujours passé de très bons moments et avec qui je serai heureux de fêter la fin de cette thèse. En particulier, merci à Clara, Jordane, Basile et Pierre. Vous êtes les meilleur.e.s et je suis certain que la fin de thèse se passera très bien pour vous.

Un immense merci à mes ami.e.s qui m'ont toujours apporté énormément d'énergie positive. Tous les moments passés avec vous sont exceptionnels et je suis heureux à vos côtés. Merci donc une nouvelle fois à Thomas mais également à Loïs, Sacha, Louisa et Marion, qui n'ont jamais été très loin de moi pendant ces quatre années et qui m'ont aidé à avancer plus sereinement dans ma thèse et dans ma vie. Merci à Emeline, Sarah, Maëva et Perrine, sur qui je peux toujours compter, malgré la distance. Vous me manquez. Enfin, merci à Bénédicte, Margot, Magali, Elodie et Marie, qui sont incroyables et que je suis très content d'avoir rencontré.

Je souhaite également remercier ma famille qui m'a toujours beaucoup soutenu. Merci en particulier à mes parents pour leur amour et leur accompagnement infailible qui m'ont aidé à grandir et devenir un adulte épanoui. Je ne vous le dis pas souvent mais je vous l'écris ici : je vous aime. Merci également à Marie-Laure et Jean-Pierre, ce n'est pas toujours facile d'être beaux-parents mais vous le faites très bien et je suis heureux que vous soyez dans ma vie depuis toutes ces années. Merci à mon frère, Pierre-Louis, qui est toujours présent lorsque j'ai

besoin de lui. Merci à mes grands-parents qui ont toujours stimulé ma curiosité intellectuelle et encouragé mes ambitions. Merci surtout pour tout l'amour qu'ils m'ont transmis.

Merci à Béatrice et Philippe pour leur très grande gentillesse et toutes leurs manifestations de soutien.

Victoria, mon amour, la seule rencontre avec toi suffit à faire de cette thèse une des meilleures décisions de ma vie. Je ne pourrai jamais assez te remercier pour toute ta patience, ta bienveillance, tes encouragements, pour tous les bons mots que tu as su trouver et pour tous les moments que tu as pris pour me rassurer et me réconforter malgré ta propre fatigue et ton propre stress. Tu es une personne formidable. J'espère avoir le privilège de passer le restant de ma vie avec toi et de te le rappeler quand tu oublieras. Je t'aime. Pour de vrai, de vrai, de vrai.

Sommaire

LISTE DES FIGURES.....	6
LISTE DES TABLEAUX.....	8
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	10
PREAMBULE.....	15
INTRODUCTION	17
I Le carcinome à cellules rénales.....	19
1 - Epidémiologie des cancers du rein	19
2 - Classification majeure des carcinomes à cellules rénales (RCC)	19
2.1 Les carcinomes à cellules claires (ccRCC).....	20
2.2 Les carcinomes papillaires (pRCC)	24
2.3 Les carcinomes chromophobes (chRCC).....	26
3 - Les altérations de la voie de réponse à l'hypoxie	26
II Voies de réponse aux dommages de l'ADN.....	30
1 - Mécanismes de réparation des dommages de l'ADN.....	30
1.1 La réparation des cassures double brin (DSBs)	32
1.1.1 La réparation par recombinaison homologue (HR)	33
1.1.2 La ligation classique d'extrémités sans matrice d'homologie (c-NHEJ).....	36
1.1.3 La ligation alternative (alt-EJ) et l'hybridation simple brin (SSA)	39
1.1.4 La régulation des mécanismes de réparation des DSBs	42
1.2 La réparation des ICLs par la voie de FANCD1/BRCA1.....	43
2 - Les voies de signalisation des dommages de l'ADN.....	48

2.1 Les poly(ADP-ribose) polymérases.....	48
2.2 Les kinases DNA-PK, ATM et ATR.....	49
2.2.1 La DNA-PKcs.....	50
2.2.2 ATM.....	51
2.2.3 ATR.....	53
2.2.4 Redondances entre DNA-PKcs, ATM et ATR.....	56
2.3 p53 dans la signalisation de la DDR.....	57
2.3.1 La régulation de p53 dans la DDR : les modifications post-traductionnelles.....	57
2.3.2 Activités majeures de p53 dans la DDR.....	59
i. Les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN.....	59
ii. L'arrêt du cycle cellulaire.....	61
iii. L'apoptose.....	62
3 - Les voies de la DDR dans les RCC	65
3.1 Liens entre la DDR et les gènes associés aux RCC	65
3.2 Altérations des gènes de la DDR dans les RCC	67
III Rôles de <i>DCLRE1B</i> dans le maintien du génome	69
1 - La famille des protéines SNM1	69
1.1 SNM1A.....	70
1.2 SNM1C/Artemis	72
1.3 SNM1B/Apollo.....	73
2 - Rôles d'Apollo dans les voies de réponses aux dommages de l'ADN	73
2.1 Apollo dans les voies de signalisation ATM/ATR et le cycle cellulaire.....	74
2.2 Liens entre Apollo et la voie FANCD/BRCA.....	75
3 - Apollo dans le maintien des télomères.....	80
3.1 La protection des télomères par le complexe shelterin.....	80
3.1.1 Formation et protection de la t-loop.....	82
3.1.2 La répression des voies de signalisation de la DDR par le shelterin	83
3.1.3 La répression des mécanismes de réparation de la DDR par le shelterin	84
3.1.4 Les rôles du complexe shelterin dans la réplication des télomères	85
3.2 Rôles d'Apollo en lien avec le complexe shelterin	86
3.2.1 Apollo : une protéine associée au shelterin.....	86
3.2.2 Rôle d'Apollo dans la génération de la région d'ADN télomérique protubérante en 3'	87

3.2.3 Rôle d'Apollo dans la réplication des télomères.....	92
4 - Associations entre <i>Apollo</i> et pathologies	93
PROJET DE THESE	97
RESULTATS	100
I Etude de la réponse aux ICLs et DSBs dans la lignée rénale HKC8.....	102
II Etude du rôle d'Apollo dans la réponse aux ICLs et DSBs dans la lignée rénale HKC8	107
1 - Impact de la diminution de l'expression d' <i>Apollo</i> (siARN <i>Apollo</i>)	107
2 - Impact de la suppression de l'expression d' <i>Apollo</i> (HKC8 <i>Apollo</i> ^{-/-}).....	109
III Article : Caractérisation des activités des formes sauvage et mutées du gène <i>Apollo</i> dans la lignée cellulaire rénale HKC8	114
1 - Résumé de l'article	114
2 - Article soumis	118
IV La surexpression d'<i>Apollo</i>^{WT}, <i>Apollo</i>^{N246I} et <i>Apollo</i>^{Y273H} dans les cellules HKC8 <i>Apollo</i>^{-/-}	150
1 - Etude par transfections stables.....	150
2 - Etude par transfections transitoires	152
V Etude des voies de signalisation associées aux activités d'Apollo dans les cellules HKC8	156
1 - Etude par transfections stables.....	156
2 - Etude par transfections transitoires	162
3 - Etude par diminution de l'expression avec des siARN	166
VI Etude des interactions protéiques d'<i>Apollo</i>^{WT}, <i>Apollo</i>^{N246I} et <i>Apollo</i>^{Y273H} dans les cellules HKC8	170

1 - Identification des partenaires potentiels d'Apollo^{WT}, Apollo^{N246I} et Apollo^{Y273H} ..	170
1.1 Etude des partenaires connus d'Apollo.....	174
1.1.1 Les protéines du complexe shelterin : TRF2 et Rap1	174
1.1.2 Les autres protéines partenaires connues d'Apollo	175
1.2 Etude des partenaires potentiels d'Apollo	177
1.2.1 ARID1A.....	177
1.2.2 SDHA.....	178
1.2.3 p53.....	179
1.2.4 FEN1	179
2 - Etude de l'homodimérisation d'Apollo.....	180
 DISCUSSION	 182
 I. Etude fonctionnelle d'Apollo dans le maintien des télomères des cellules rénales	 184
1 - Le rôle d'Apollo dans la protection des télomères des cellules rénales	184
2 - Les mutations N246I et Y273H inhibent l'activité protectrice d'Apollo vis-à-vis des télomères	190
 II Etude fonctionnelle d'Apollo dans la DDR des cellules rénales.....	 194
1 - Rôle d'Apollo dans la réponse cellulaire aux ICLs et DSBs	194
2 - Rôle d'Apollo dans les voies de signalisation des dommages de l'ADN	199
 III Etude des liens entre Apollo et l'oncogénèse rénale.....	 203
1 - L'impact d'Apollo sur la stabilité télomérique	203
2 - Les interactions fonctionnelles entre Apollo et p53.....	204
3 - Les liens entre Apollo et les gènes de l'oncogénèse rénale	206
 IV Conclusion	 208
 BIBLIOGRAPHIE.....	 212

ANNEXES 238

I Matériels et méthodes complémentaires 240

1 - Quantification de l'apoptose par cytométrie en flux 240

2 - Vecteur d'expression flag-Apollo 240

3 - Edition avec CRISPR Cas9 et séquençage des clones 241

4 - Listes des anticorps et amorces ADN de RT-qPCR 242

Liste des figures

Figure 1 : La régulation des facteurs de transcription HIF α	22
Figure 2 : Principales altérations génétiques et voies de signalisation associées dans les ccRCC.	23
Figure 3 : Altérations génétiques et voies de signalisation associées à l'activation de HIF α dans les RCC.....	28
Figure 4 : Dommages de l'ADN et mécanismes de réparation associés.....	32
Figure 5 : Mécanisme de réparation des DSBs par HR.....	34
Figure 6 : Mécanisme du c-NHEJ dans la réparation des DSBs avec différentes configurations.	38
Figure 7 : Points communs et différences entre les mécanismes HR, alt-EJ et SSA.....	40
Figure 8 : Mécanismes de réparation des ICLs par la voie FANCD1/BRCA1 en fonction des différents modèles.....	46
Figure 9 : Structures des kinases ATM, ATR et DNA-PKcs.....	50
Figure 10 : La voie de signalisation ATM en réponse aux DSBs.....	52
Figure 11 : La voie ATR dans la réponse aux dommages de l'ADN.....	55
Figure 12 : Modifications post-traductionnelles de p53 associées à l'activité des PIKKs de la DDR.....	58
Figure 13 : La voie p53-p21-DREAM de régulation du cycle cellulaire.....	62
Figure 14 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.....	63
Figure 15 : Structures de la protéine Pso2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) et de ses homologues SNM1A, SNM1B et SNM1C chez l'humain.....	69
Figure 16 : Modèles proposés pour le mécanisme d'action d'Apollo dans la réparation des ICLs.	79
Figure 17 : Le complexe shelterin et la formation de la structure t-loop.....	81
Figure 18 : L'activité d'Apollo dans la génération de l'extrémité 3' protubérante des télomères en coopération avec POT1b et EXO1 dans les MEFs.....	89

Figure 19 : La régulation de l'activité d'Apollo aux télomères en fonction de l'interaction entre TRF2 et NBS1 dans les cellules humaines.	91
Figure 20 : L'activité d'Apollo dans la résolution du stress topologique des télomères dans les cellules humaines.	93
Figure 21 : Etude par immunofluorescence des foci γ H2AX dans les cellules HKC8 suite à des traitements génotoxiques.	102
Figure 22 : Analyse du niveau d'apoptose des cellules HKC8 par cytométrie en flux.....	105
Figure 23 : Analyse de marqueurs protéiques associés à la DDR ou à l'apoptose dépendante de p53 dans les cellules HKC8 par Western Blot.	106
Figure 24 : La diminution de l'expression d'Apollo dans les cellules HKC8 induit une augmentation de l'apoptose en réponse aux ICLs et aux DSBs.	108
Figure 25 : Analyse de la quantité d'ARNm <i>Apollo</i> dans les clones HKC8 sélectionnés à l'issue de l'édition par CRISPR Cas 9.....	110
Figure 26 : Analyse de l'induction de l'apoptose en réponse aux DSBs et ICLs dans les clones HKC8 présentant une altération de la séquence ADN d' <i>Apollo</i>	113
Figure 27 : Analyse de l'induction de l'apoptose en réponse aux ICLs dans les cellules HKC8 et HKC8 <i>Apollo</i> ^{-/-} transfectées de façon stable avec un vecteur vide, <i>Apollo</i> ^{WT} , <i>Apollo</i> ^{N246I} ou <i>Apollo</i> ^{Y273H}	151
Figure 28 : Etude de l'impact de la surexpression transitoire d' <i>Apollo</i> ^{WT} , <i>Apollo</i> ^{N246I} et <i>Apollo</i> ^{Y273H} sur la prolifération et la sensibilité au cisplatine des cellules HKC8 <i>Apollo</i> ^{-/-}	153
Figure 29 : Etude de l'activation de la voie ATM dans les cellules HKC8 <i>Apollo</i> ^{-/-} transfectées de façon stable avec <i>Apollo</i> ^{WT} , <i>Apollo</i> ^{N246I} ou <i>Apollo</i> ^{Y273H}	158
Figure 30 : Analyse de l'activation de la voie p53 dans les cellules HKC8 <i>Apollo</i> ^{-/-} transfectées de façon stable avec <i>Apollo</i> ^{WT} , <i>Apollo</i> ^{N246I} ou <i>Apollo</i> ^{Y273H}	160
Figure 31 : Etude de l'expression de <i>HIF1α</i> et <i>HIF2α</i> dans les cellules HKC8 <i>Apollo</i> ^{-/-} transfectées de façon stable avec <i>Apollo</i> ^{WT} , <i>Apollo</i> ^{N246I} ou <i>Apollo</i> ^{Y273H}	162
Figure 32 : Etude de l'impact de la surexpression transitoire d' <i>Apollo</i> ^{WT} , <i>Apollo</i> ^{N246I} et <i>Apollo</i> ^{Y273H} sur l'activation de la voie de signalisation de p53 dans les cellules HKC8 <i>Apollo</i> ^{-/-}	164
Figure 33 : Etude de l'impact de la surexpression transitoire d' <i>Apollo</i> ^{WT} , <i>Apollo</i> ^{N246I} et <i>Apollo</i> ^{Y273H} sur l'expression de <i>HIF2α</i> dans les cellules HKC8 <i>Apollo</i> ^{-/-}	166

Figure 34 : Etude des co-régulations transcriptionnelles de <i>p53</i> et <i>Apollo</i> dans les cellules HKC8.	167
Figure 35 : Etude de l'expression de <i>HIF1α</i> et <i>HIF2α</i> en fonction de l'expression d' <i>Apollo</i> dans les cellules HKC8.....	168
Figure 36 : Détail des différentes conditions expérimentales analysées par spectrométrie de masse.	171
Figure 37 : Etude de l'interaction entre <i>Apollo</i> et <i>ARID1A</i> dans les cellules HKC8 par Western blot.....	178
Figure 38 : Etude de l'homodimérisation d' <i>Apollo</i> et de l'impact des mutations sur cette interaction dans les cellules HKC8 par Western blot.....	181
Figure 39 : Schéma récapitulatif des résultats de notre étude sur l'impact de la suppression de l'expression d' <i>Apollo</i> ^{WT} et de l'expression des formes mutées d' <i>Apollo</i> (<i>Apollo</i> ^{N246I} , <i>Apollo</i> ^{Y273H}) sur le maintien des télomères dans les cellules HKC8.....	185
Figure 40 : Schéma récapitulatif de la réponse des cellules HKC8 aux drogues inductrices d'ICLs ou de DSBs en fonction du niveau d'expression et du statut mutationnel d' <i>Apollo</i>	196

Liste des tableaux

Tableau 1 : Analyse des séquences ADN du gène <i>Apollo</i> dans les clones HKC8 obtenus à l'issue de l'édition par CRISPR Cas 9.....	111
Tableau 2 : Liste de potentiels partenaires protéiques d' <i>Apollo</i> ^{WT} , <i>Apollo</i> ^{N256I} ou <i>Apollo</i> ^{Y273H} identifiés par spectrométrie de masse.	173
Tableau 3 : Comparaison de la quantité de peptides de TRF2 co-immunoprécipitée avec <i>Apollo</i> ^{N246I} ou <i>Apollo</i> ^{Y273H} par rapport à <i>Apollo</i> ^{WT} par spectrométrie de masse.....	174
Tableau 4 : Comparaison de la quantité de peptides de TRF2 co-immunoprécipitée avec <i>Apollo</i> ^{WT} , <i>Apollo</i> ^{N246I} ou <i>Apollo</i> ^{Y273H} en présence de cisplatine par rapport à en absence de traitement par spectrométrie de masse.....	175
Tableau 5 : Liste des séquences ADN ciblées par les différents gARN utilisés pour l'édition du gène <i>Apollo</i> par la technique CRISPR Cas 9.....	241

Tableau 6 : Liste des amorces ADN utilisées pour le séquençage ADN des clones issus de l'édition par CRISPR Cas9.....	241
Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés dans les Western blots.....	242
Tableau 8 : Liste des amorces ADN utilisées dans les RT-qPCR.	243

Liste des abréviations

#

53BP1 : p53-Binding Protein 1
9-1-1 : RAD9-RAD1-HUS1

A

alt-EJ : alternative End Joining
AML : Acute Myeloid Leukemia
APAF-1 : Apoptotic Protease-Activating Factor 1
ARID1A : AT-Rich Interaction Domain 1A
ARNT : Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator protein
ATM : Ataxia-Telangiectasia Mutated
ATR : Ataxia-Telangiectasia mutated and Rad3 related
ATRIP : ATR-Interacting Protein

B

BAF : Brahma Associated Factor
BAP1 : BRCA1 Associated Protein 1
BAK : BCL-2 antagonist or Killer
BAX : BCL-2-associated X protein
β-CASP : CPSF, Artemis, SNM1, PSO2
BCL-2 : B-Cell Lymphoma 2 protein
BER : Base Excision Repair
BHD : Birt-Hogg-Dubé
BID : BH3 Interacting-Domain death agonist
BLM : Bloom helicase
BMF : Bone Marrow Failure
BRCA1 : Breast Cancer 1
BRCA2 : Breast Cancer 2

C

CARD : Caspase Recruitment Domain
CBP : CREB-binding protein
ccRCC : clear cell Renal Cell Carcinoma

CDC25 : Cell Division Cycle-25
CDK : Cyclin Dependent Kinase
CDKN1A : Cyclin Dependent Kinases inhibitor 1A
CDKN2A : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CENPS : Centromere Protein S
CENPX : Centromere Protein X
CHDL1 : Chromodomain Helicase/ATPase DNA-binding protein 1-Like
CHK1 : Checkpoint Kinase 1
CHK2 : Checkpoint Kinase 2
chRCC : chromophobe Renal Cell Carcinoma
CMG : CDC45-Mcm2-7-GINS
c-NHEJ : classical Non-Homologous End Joining
CtIP : Carboxy-terminal binding protein (CtBP)-Interacting Protein
CST : CTC1-STN1-TEN1
CTD : C-Terminal Domain

D

DC : Dyskeratose Congenitale
DCLRE1A : DNA Cross-Link Repair 1A
DCLRE1B : DNA Cross-Link Repair 1B
DCLRE1C : DNA Cross-Link Repair 1C
DDR : DNA Damage Response
DED : DEAD Effector Domain
dHJ : double Holliday Junction
DIOC : 3,3'-Dihydroxyoxycarbocyanine Iodide
DISC : Death-Inducing Signaling Complex
DNA2 : DNA Replication Helicase/Nuclease 2
DNA-PKcs : DNA-dependant Protein Kinase catalytic subunit
DREAM : Dimerization partner RB-like, E2F, MuvB
DSB : DNA Double-Strand Break

E

E2F : E2F Transcription Factor
eIF-4E : eukaryotic translation Initiation Factor 4E
EME1 : Essential Meiotic Structure-Specific Endonuclease 1
ERCC1 : ERCC Excision Repair 1, Endonuclease Non-Catalytic Subunit
ERCC4 : Excision Repair 4, Endonuclease Catalytic Subunit
ETAA1 : Ewing Tumor-Associated Antigen 1
EXO1 : Exonuclease 1

F

FAAD : Fas-Associated Death Domain factor
FAAP : Fanconi-Associated Protein
FAN1 : FANCD2 and FANCI Associated Nuclease 1
FANCF : Fanconi Anemia Complementation group
FAT : FRAP, ATM, TRRAP
FEN1 : Flap Endonuclease 1
FH : Fumarate Hydratase
FLCN : Folliculin

G

GEN1 : Flap Endonuclease GEN Homolog 1

H

HEAT : Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HGFR : Hepatocyte Growth Factor Receptor
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HH : Hoyeraal-Hreidarsson
HKC8 : Human Kidney Clone 8

HLRCC : Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer

HNSC : Head and Neck Squamous Carcinoma

HPRCC : Hereditary Papillary Renal Cell Carcinoma

HR : Homologous Recombination

HRE : Hypoxia Response Elements

HSP40 : Heat Shock Protein 40

HSP70 : Heat Shock Protein 70

HtrA2 : High-Temperature Requirement A2

I

ICL : DNA Interstrand Crosslink

ID2 : FANCI-FANCD2

INCa : Institut National du Cancer

IR : Ionizing Radiation

IRES : Internal Ribosome Entry Site

K

Ku : Ku70-Ku80

L

LIG4 : ADN ligase IV

LLB (LCL) : Lymphoblastoid Cell Line

M

MAD2L2 : Mitotic Arrest Deficient 2 Like 2

MAR : Mono(ADP-ribose)

MBL : Metallo- β -Lactamase

MDC1 : Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1

MDM2 : Murine Double Minute 2

MEFs : Mouse Embryonic Fibroblasts

MMC : Mitomycin C

MMR : Mismatch Repair

MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

MRE11 : MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease

MRN : MRE11-RAD50-NBS1

mTOR : mechanistic Target of Rapamycin

MTS : Multi-Telomeric Signals

MUS81 : MUS81 Structure-Specific
Endonuclease Subunit

MuvB : Multivulval class B

N

NBS1 : Nijmegen Breakage Syndrome 1

NER : Nucleotide Excision Repair

NF2 : Neurofibromin 2

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B

P

PALB2 : Partner And Localizer of BRCA2

PAR : Poly(ADP-Ribose)

PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymerase

PAXX : Parologue of XRCC4 and XLF

PBAF : Polybromo-associated BAF

PBRM1 : Polybromo 1

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PHD : Prolyl Hydroxylase Domain

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase

PI3KCA : Phosphatidylinositol-4,5-
biphosphate 3-kinase Catalytic subunit
Alpha

PIKK : Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-
related Kinase

PMAIP1 : Phorbol-12-Myristate-13-
Acetate-Induced Protein 1

Pol : Polymérase

POT1 : Protection of Telomeres 1

PP1-α : Protein Phosphatase 1 alpha

pRCC : papillary Renal Cell Carcinoma

PRD : Proline-Roch Domain

PREDIR : PREDIspositions aux tumeurs du
Rein

PSO2 : sensitive to Psoralen 2

PTEN : Phosphatase and Tensin homolog

PUMA : p53 Upregulated Modulator of
Apoptosis

R

RAD50 : RAD50 Homolog, Double Strand
Break Repair Protein

RAD51 : RAD51 Recombinase

RAD52 : RAD52 Homolog, DNA Repair
Protein

Rap1 : Repressor-activator protein 1

RBX1 : Ring-Box 1

RCC : Renal Cell Carcinoma

REV1 : DNA Directed Polymerase

REV3 : REV3 Like, DNA Directed
Polymerase Zeta Catalytic Subunit

RIF1 : Replication Timing Regulatory
Factor 1

RPA : Replication Protein A

RNF8 : RING Finger 8

ROS : Reactive Oxygen Species

RRM2 : Ribonucleotide-diphosphate
Reductase subunit M2

RTEL1 : Regulator Of Telomere Elongation
Helicase 1

S

SAV1 : Salvador Family WW Domain
Containing Protein 1

SCID : Severe Combined
Immunodeficiency

SDH : Succinate Dehydrogenase

SDSA : Synthesis-Dependent Strand
Annealing

SETD2 : SET Domain containing 2

SLX1 : SLX1 Structure-Specific
Endonuclease Subunit

SLX4 : SLX4 Structure-Specific
Endonuclease Subunit

Smac/DIABLO : Second Mitochondria-
derived Activator of Caspases/ Direct IAP-
Binding protein with LOw PI

SMARCA4 : SWI/SNF related, Matrix
associated, Actin dependant Regulator of
Chromatin, subfamily A, member 4

SMARCA5 : SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependant Regulator of Chromatin, subfamily A, member 5
SMARCAL1 : SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, subfamily A-Like 1)
SMARCB1 : SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependant Regulator of Chromatin, subfamily B, member 1
SNM1 : Sensitive to Nitrogen Mustard 1
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SOCS1 : Suppressor Of Cytokine Signaling 1
SSA : Single-Strand Annealing
SSB : Single Strand Break
SSBR : Single Strand Break Repair
SV40 : Simian Virus 40
SWI/SNF : Switch/Sucrose Non Fermentable

T

TBD : Telomere Biology Disorder
TCGA : The Cancer Genome Atlas
TD : Tetramerization Domain
TERC : Telomerase RNA Component
TERT : Telomerase Reverse Transcriptase
TFE3 : Transcription Factor binding to IGHM Enhancer 3
TFEB : Transcription Factor EB
TGF α : Transforming Growth Factor α
TIF : Telomere dysfunction-Induced Foci
TIN2 : TRF1-Interacting Nuclear protein 2
TNF-R : Tumor Necrosis Factor Receptor
TOPBP1 : DNA Topoisomerase 2-Binding Protein 1

TOPOIII : Topoisomérase 3 α
TP53 : Tumor Protein p53
TPP1 : TIN2 and POT1 organizing protein
TRADD : TNF-R-Associated Death Domain protein
TRF1 : Telomeric Repeat Factor 1
TRF2 : Telomeric Repeat Factor 2
TRFH : TRF Homology domain
TSC1 : Tuberous Sclerosis Complex subunit 1
TSC2 : Tuberous Sclerosis Complex subunit 2
TUBB3 : Tubulin Beta 3 Class III

U

UFL1 : UFM1 Specific Ligase 1
UV : Ultraviolet

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VHL : von Hippel-Lindau
VP : Variant Pathogénique

W

WRN : Werner helicase/nuclease

X

XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis
XLF : XRCC4-Like Factor
XRCC4 : X-ray Repair Cross-Complementing protein 4

Préambule

L'unité UMR 9019 « Intégrité du Génome et Cancers » est constituée de quatre équipes dont les recherches visent à mieux comprendre les mécanismes d'induction, de tolérance et de réparation des lésions de l'ADN et leur régulation, ainsi que les conséquences des anomalies de la réponse à ces lésions en termes de stabilité du génome.

L'équipe « Mécanismes de réparation de l'ADN et cancérogenèse » dirigée par le Dr Murat SAPARBAEV développe des projets dont les principaux objectifs visent à mieux comprendre et définir les mécanismes de signalisation et de réparation des dommages de l'ADN et les liens entre ces mécanismes et les processus de l'oncogenèse. Au sein de cette équipe, le groupe de recherche « Cancer du Rein » dirigé par le Pr Stéphane RICHARD se consacre à l'étude des altérations génétiques héréditaires dans la prédisposition aux cancers du rein, en particulier les altérations relatives aux voies de réponse aux dommages de l'ADN. Les travaux de ce groupe sont notamment rendus possibles par l'accès à la collection unique d'échantillons (sang, tumeurs congelées ou en paraffine) et aux données cliniques de patients inclus dans le Réseau National de Référence pour Cancers Rares de l'Adulte PREDIR (PREDispositions aux tumeurs du Rein), labellisé par l'Institut National du Cancer (INCa) et coordonné par le Pr Stéphane RICHARD. L'accès à cette collection a permis l'identification de nouveaux gènes potentiels de prédisposition aux carcinomes cellulaires rénaux (RCC), le type histologique de cancer du rein le plus fréquent. Parmi ces gènes, l'équipe a identifié le gène *DCLRE1B/Apollo* impliqué dans le maintien des télomères et dans les voies de réponse aux dommages de l'ADN (DNA Damage Response, DDR) de type cassures double brin (DNA Double-Strand Break, DSB) et liaisons inter-brins de l'ADN (DNA Interstrand Crosslink, ICL).

Dans la première partie de mon introduction, je présenterai les sous-types histologiques majeurs de RCC ainsi que les principales altérations génétiques associées. J'introduirai ensuite les mécanismes de réparation des DSBs et ICLs et présenterai une synthèse des voies de signalisation associées à ces mécanismes. Finalement, je détaillerai les différentes fonctions du gène *DCLRE1B/Apollo* dans le maintien de l'intégrité du génome. Par la suite, je présenterai les

résultats obtenus au cours de mon projet de thèse concernant l'étude fonctionnelle d'Apollo dans le maintien des télomères et la DDR dans les cellules rénales épithéliales humaines HKC8 (Human Kidney Clone 8). Je présenterai également les résultats concernant la caractérisation de l'impact des mutations d'*Apollo*, détectées chez les patients du réseau PREDIR, sur ses activités dans les cellules HKC8. Enfin, je discuterai de l'ensemble de ces résultats et présenterai les principales conclusions de mon projet de thèse ainsi que les perspectives associées.

Introduction

I Le carcinome à cellules rénales

1 - Epidémiologie des cancers du rein

Le nombre de nouveaux cas de cancers du rein est estimé à 15000 par an en France métropolitaine selon le rapport de l'INCa de 2019 (*Tumeurs solides - Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018*, 2019). D'autre part, près de 5500 patients atteints de cancer du rein décèdent chaque année. La classification en fonction du genre indique une prévalence chez les hommes avec des taux d'incidence et de mortalité homme/femme de 2,4 et 3,3, respectivement. Concernant l'âge, le taux d'incidence augmente à partir de 30 ans et atteint sa valeur maximale entre 80 et 84 ans. L'âge médian au diagnostic est de 67 ans chez l'homme et 70 ans chez la femme. Bien que les chiffres du cancer du rein soient relativement faibles par rapport à d'autres types de cancers, ces chiffres connaissent une progression importante. Le nombre de nouveaux cas par an est ainsi passé de ~4000 à ~10000 pour l'homme et de ~2000 à ~5000 pour la femme entre 1990 et 2018. Selon le rapport de l'INCa, cette augmentation est en partie expliquée par l'évolution démographique et le vieillissement de la population (*Tumeurs solides - Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018*, 2019). L'augmentation du nombre de cas de cancers du rein peut également être expliquée par les progrès technologiques et médicaux ayant conduit à une augmentation de son taux de détection fortuite chez des patients venus consulter pour d'autres raisons (Hsieh et al., 2017). En effet, les cancers du rein tendent à être asymptomatiques et 30% des patients présentent des métastases au moment du diagnostic (Hsieh et al., 2018). De son côté, le taux de mortalité reste stable au cours du temps en France (*Tumeurs solides - Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018*, 2019). Les principaux facteurs de risque du cancer du rein incluent l'obésité, l'hypertension artérielle, le tabac et la prédisposition génétique. Concernant ce dernier facteur, environ 3-5% des cancers du rein sont associés à des syndromes héréditaires (Hsieh et al., 2017).

2 - Classification majeure des carcinomes à cellules rénales (RCC)

Les carcinomes à cellules rénales (Renal Cell Carcinoma, RCC) sont des tumeurs malignes issues de l'épithélium des tubules rénaux et représentent environ 90% des cas de cancers du rein

(Hsieh et al., 2018). Les RCC constituent un ensemble de cancers hétérogènes différenciés en fonction de leur origine cellulaire, leur histologie, leur évolution clinique et en fonction des altérations génétiques associées à leur émergence (Linehan & Ricketts, 2019). Les principaux types histologiques de RCC sont répartis entre les carcinomes à cellules claires (clear cell RCC, ccRCC) (~75%), les carcinomes papillaires (papillary RCC, pRCC) (~15%) et les carcinomes chromophobes (chromophobe RCC, chRCC) (~5%) (Hsieh et al., 2018; Linehan & Ricketts, 2019). Cette classification histologique est largement associée à une classification des altérations génétiques et moléculaires détectées dans les tumeurs, participant à une meilleure distinction des différents sous-types de RCC (Hsieh et al., 2018; Moch et al., 2022).

2.1 Les carcinomes à cellules claires (ccRCC)

Comme leur nom l'indique, les ccRCC présentent une histologie définie par l'apparence claire du cytoplasme des cellules qui les constituent. Au niveau chromosomique, les ccRCC sont majoritairement caractérisés par la perte du bras court du chromosome 3 (3p), laquelle est identifiée dans ~80-90% des cas et constitue un des premiers événements de l'oncogenèse rénale. Le gain du chromosome 5q et la perte du chromosome 14q sont également des événements fréquents et caractéristiques des ccRCC (Creighton et al., 2013; Ricketts et al., 2018; Turajlic et al., 2018).

La région du chromosome 3p contient en particulier le gène *VHL* (3p25-3p26) originellement identifié comme responsable de la maladie de von Hippel-Lindau (VHL), une maladie héréditaire rare prédisposant au développement de différents types de tumeurs bénignes et malines hautement vascularisées dont des ccRCC bilatéraux et multicentriques (Latif et al., 1993; Richard et al., 2013). Au-delà des formes héréditaires de ccRCC associées à la maladie de VHL, la majorité des ccRCC sporadiques présente une perte du chromosome 3p, une mutation de *VHL* ou une hyperméthylation de son promoteur (Creighton et al., 2013; Sato et al., 2013; Turajlic et al., 2018). *VHL* constitue donc un gène majeur associé au développement des ccRCC héréditaires et sporadiques. La protéine pVHL interagit avec les élongines B et C, la Culline 2 et RBX1 (Ring-Box 1) pour former un complexe E3 ubiquitine ligase responsable de l'ubiquitinylation et de la dégradation par le protéasome. En particulier, ce complexe cible les sous-unités α du facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor), essentiel à la

régulation de l'homéostasie cellulaire dépendante du taux d'oxygène. Les facteurs de transcription HIF sont ainsi constitués d'une sous-unité β constitutive, HIF1 β (ou ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator protein)), et de l'une des trois sous-unités α , HIF1 α , HIF2 α ou HIF3 α (Dengler et al., 2014; Linehan et al., 2019; Richard et al., 2013). Les sous-unités α sont ubiquitinylées et dégradées en condition de normoxie, c'est-à-dire en présence d'une concentration normale d'oxygène (21%). Dans ce contexte, les prolyl hydroxylases dépendantes de l'oxygène, du fer et de l' α -ketoglutarate (Prolyl Hydroxylase Domain enzyme, PHD) catalysent l'hydroxylation des sous-unités HIF α . Cette modification post-traductionnelle induit la liaison de pVHL avec HIF α et la dégradation de HIF α par le protéasome. A l'inverse, en condition d'hypoxie, c'est-à-dire de faible concentration d'oxygène (1%), ou de diminution du taux de fer, les enzymes PHD deviennent inactives ce qui résulte en une inhibition de l'interaction entre les sous-unités HIF α et le complexe pVHL. En conséquence, les sous-unités HIF α ne sont pas dégradées par le protéasome et s'associent avec la sous-unité HIF β . Le complexe HIF α / HIF1 β est transloqué vers le compartiment nucléaire et active la transcription de gènes contenant des séquences spécifiques de réponse à l'hypoxie (Hypoxia Response Elements, HRE) (Dengler et al., 2014; Linehan et al., 2019; Richard et al., 2013) (**Figure 1**). Dans le cas d'une inactivation du gène *VHL*, les sous-unités HIF α demeurent stables indépendamment du taux d'oxygène ou de fer et induisent une activation constitutive du « programme de transcription » de HIF. Celui-ci favorise notamment l'angiogenèse en augmentant le niveau du facteur de croissance VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ainsi que la prolifération cellulaire en augmentant le niveau des facteurs de croissance PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et TGF α (Transforming Growth Factor α) (Linehan et al., 2019).

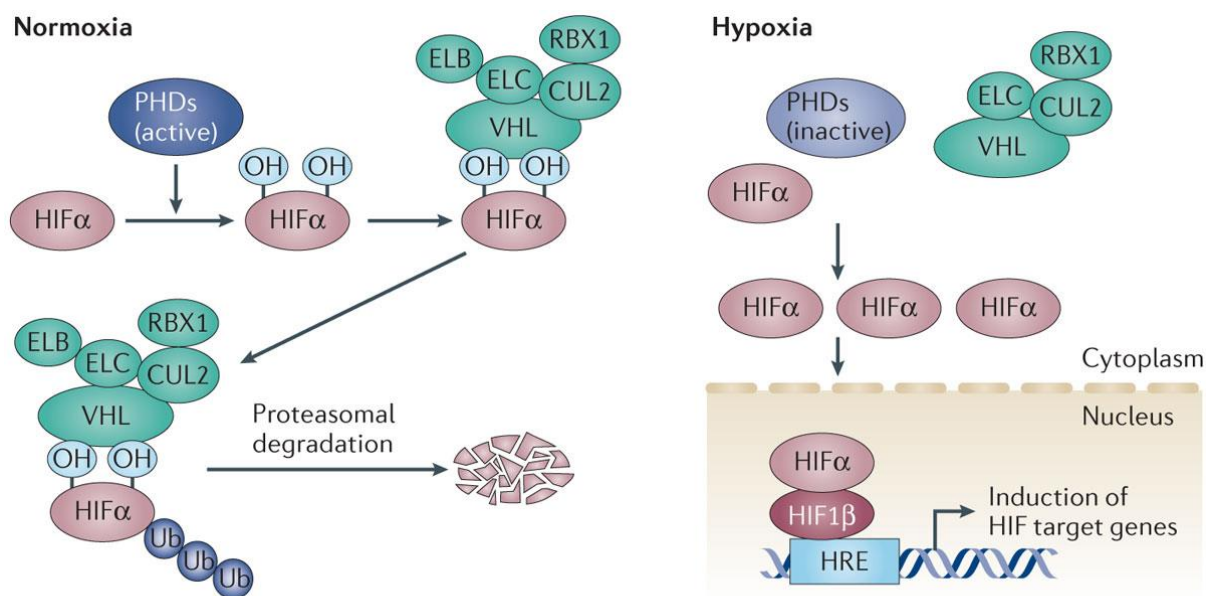


Figure 1 : La régulation des facteurs de transcription HIFα.

En condition de normoxie, les sous-unités HIFα sont hydroxylées par les enzymes PHD. Cette modification post-traductionnelle induit la liaison de pVHL avec HIFα et la dégradation de HIFα par le protéasome. En condition d'hypoxie, les enzymes PHD deviennent inactives et les sous-unités HIFα ne sont pas dégradées par le protéasome. La sous-unité HIFα s'associe avec la sous-unité HIFβ pour former le complexe HIFα/ HIF1β. Ce complexe est transloqué vers le compartiment nucléaire et active la transcription de gènes contenant des séquences HRE. Figure issue de (Gossage et al., 2015).

Hormis *VHL*, trois gènes fréquemment mutés dans les ccRCC sporadiques, à savoir *PBRM1* (Polybromo 1), *SETD2* (SET Domain containing 2) et *BAP1* (BRCA1 Associated Protein 1), sont également localisés sur le chromosome 3p. L'ensemble de ces gènes codent des protéines associées au remodelage de la chromatine : *PBRM1* code la protéine PBRM1 membre du complexe SWI/SNF (Switch/Sucrose Non Fermentable) tandis que *SETD2* et *BAP1* codent respectivement l'histone méthyltransferase SETD2 et la protéine de de-ubiquitylation des histones BAP1 (Creighton et al., 2013; Sato et al., 2013; Turajlic et al., 2018). De plus, indépendamment de la localisation sur le chromosome 3p, les gènes de remodelage de la chromatine sont fréquemment mutés dans les ccRCC. En particulier, les mutations des gènes membres du complexe SWI/SNF incluant *PBRM1*, *ARID1A* (AT-Rich Interaction Domain 1A) et *SMARCA4* (SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependant Regulator of Chromatin,

subfamily A, member 4) sont identifiées dans 47,1% des ccRCC (Linehan & Ricketts, 2019) (**Figure 2**).

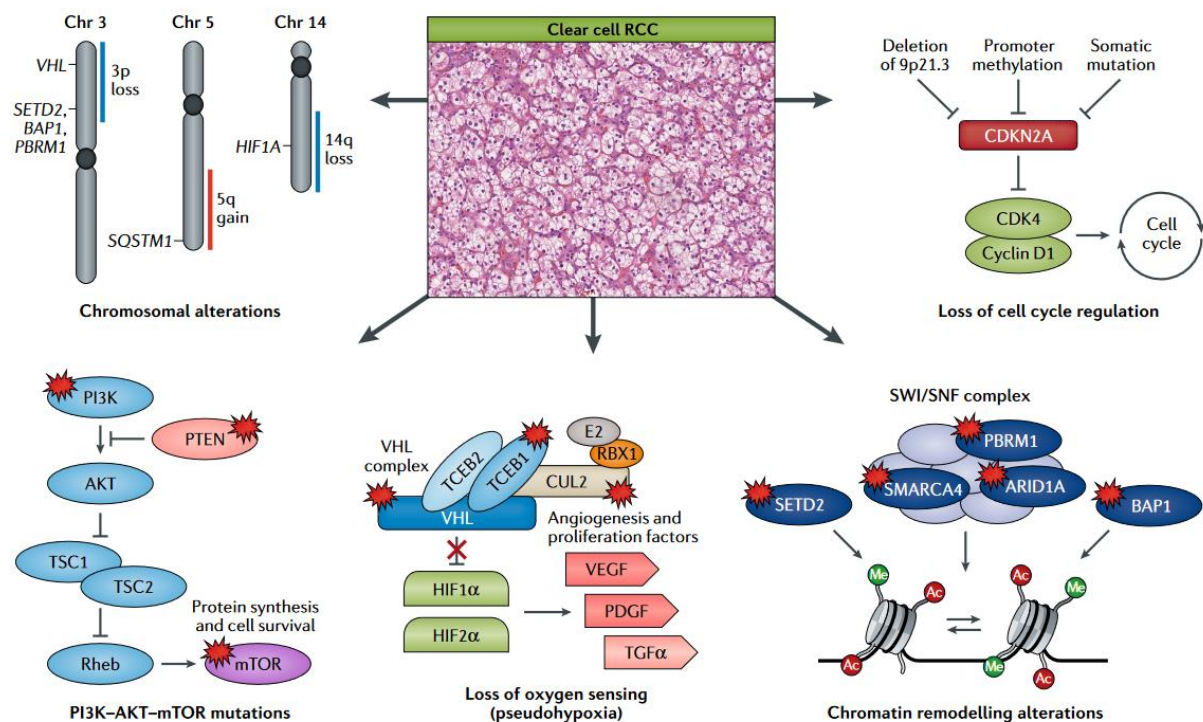


Figure 2 : Principales altérations génétiques et voies de signalisation associées dans les ccRCC.

Au niveau chromosomique, les ccRCC sont majoritairement caractérisés par la perte du chromosome 3p, le gain du chromosome 5q et la perte du chromosome 14q. Le chromosome 3p contient en particulier les gènes *VHL*, *SETD2*, *BAP1* et *PBRM1*. Les voies cellulaires les plus fréquemment impactées par les altérations génétiques dans les ccRCC incluent la voie de réponse à l'hypoxie, les voies de remodelage de la chromatine, la voie *PI3K-AKT-mTOR* et les voies de régulation du cycle cellulaire. Les symboles rouges (ou la case rouge pour *CDKN2A*) indiquent les protéines codées par les principaux gènes altérés dans les ccRCC. Figure issue de (Linehan & Ricketts, 2019).

Les mutations dans les gènes codant des protéines associées à la voie « Phosphoinositide 3-Kinase (*PI3K*)-*AKT*-mechanistic Target of Rapamycin (*mTOR*) » tels que *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog), *MTOR* et *PI3KCA* (Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase Catalytic subunit Alpha) sont également caractéristiques des altérations génétiques des ccRCC, identifiées dans environ 16% des tumeurs (Linehan & Ricketts, 2019; Turajlic et al., 2018) (**Figure 2**). Ces altérations sporadiques induisent une augmentation de l'activation de la voie *PI3K-AKT-mTOR* impliquée dans la synthèse protéique et la survie cellulaire et favorisent ainsi

le développement tumoral rénal (Linehan et al., 2019). Finalement, environ 16% des tumeurs ccRCC présentent une perte d'expression du gène *CDKN2A* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) codant la protéine p16^{INK4A} qui inhibe les complexes associant les kinases CDK4/CDK6 (Cyclin Dependent Kinase) et la cycline D1. Ces tumeurs ccRCC sont ainsi caractérisés par une dérégulation du cycle cellulaire (**Figure 2**) (Linehan & Ricketts, 2019).

En plus des altérations principales précédemment décrites, les ccRCC se caractérisent plus généralement par une hétérogénéité génétique intra-tumorale élevée. Dans la majorité des cas, une unique tumeur ccRCC inclue ainsi de multiples populations sous-clonales présentant des altérations génétiques distinctes (Gerlinger et al., 2014; Turajlic et al., 2018).

2.2 Les carcinomes papillaires (pRCC)

Les pRCC étaient classiquement divisés en deux sous-types désignés comme le type I et le type II. Cette classification a récemment été modifiée, notamment pour prendre en compte la grande hétérogénéité génétique des pRCC anciennement désignés comme les pRCC de type II (Moch et al., 2022). Malgré l'évolution de la classification des pRCC, la majorité des revues de la littérature actuellement disponible présente l'ancienne classification des pRCC de type I et de type II. Dans cette partie, je présente donc également l'ancienne classification des pRCC.

Au niveau histologique, les tumeurs pRCC de type I étaient décrites comme présentant des structures tubulaires et papillaires avec des cellules caractérisées par un cytoplasme basophile et un petit noyau tandis que les tumeurs pRCC de type II étaient décrites comme présentant des structures papillaires de grandes cellules caractérisées par un cytoplasme éosinophile et un large noyau (Linehan & Ricketts, 2019; Linehan WM et al., 2016).

Au niveau chromosomique, les pRCC de type I étaient caractérisés par des gains fréquents des chromosomes 7 et 17. Le gène *MET/HGFR* (Hepatocyte Growth Factor Receptor) est localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q31) et code la protéine c-MET, un récepteur à activité tyrosine kinase du facteur de croissance des hépatocytes (Hepatocyte Growth Factor, HGF), impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire *via* l'activation de différentes voies dont la voie PI3K-AKT-mTOR (Linehan et al., 2019). Des mutations ponctuelles activatrices de *MET* sont identifiées dans 18,6% des tumeurs pRCC de type I. De plus, d'autres types d'altérations du gène *MET* (variants d'épissage, fusions chromosomiques) ou des amplifications du

chromosome 7 ont été décrites dans des tumeurs pRCC de type I. Le pourcentage total des altérations du gène *MET* est estimé à près de 80% de l'ensemble des tumeurs pRCC de type I. En conséquence, *MET* constitue le gène le plus fréquemment altéré dans les pRCC de type I (Linehan & Ricketts, 2019; Linehan WM et al., 2016). D'autre part, les altérations constitutives de *MET* sont responsables du développement du RCC papillaire héréditaire (Hereditary Papillary Renal Cell Carcinoma, HPRCC), un syndrome prédisposant aux pRCC de type 1 bilatéraux et multifocaux (Hasumi & Yao, 2018; Schmidt L et al., 1997; Sebai et al., 2022).

D'un autre côté, les tumeurs pRCC de type II étaient décrites comme présentant un schéma d'altérations chromosomiques plus variable. Néanmoins, la perte du chromosome 22 étaient fréquemment identifiée dans ce sous-type de pRCC. Le chromosome 22 comporte notamment le gène *SMARCB1* (SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependant Regulator of Chromatin, subfamily B, member 1) codant une protéine du complexe SWI/SNF et le gène *NF2* (Neurofibromin 2) codant un régulateur de la voie Hippo de régulation de la prolifération et de la survie cellulaire. La voie Hippo apparaît comme une voie importante des pRCC de type II, altérée dans 10% des tumeurs, en raison de mutations dans différents gènes de cette voie, dont *NF2* et *SAV1* (Salvador Family WW Domain Containing Protein 1). Les gènes *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1* codant des protéines associées au remodelage de la chromatine et fréquemment mutés dans les ccRCC, sont également mutés dans les tumeurs pRCC de type II. La perte d'expression du gène *CDKN2A*, due à la perte du chromosome 9p21.3 ou une hyperméthylation de son promoteur, est une altération fréquente, retrouvée dans 18-25% des pRCC de type II. D'autre part, environ 10% des pRCC de type II présentent des fusions de gènes, suite à des translocations chromosomiques, impliquant *TFE3* (Transcription Factor binding to IGHM Enhancer 3) ou *TFEB* (Transcription Factor EB), deux membres de la famille des facteurs de transcription MiT. Ces fusions résultent en une dérégulation de l'expression des gènes cibles de ces facteurs de transcription et peuvent altérer la croissance et le métabolisme cellulaire (Linehan & Ricketts, 2019; Linehan WM et al., 2016; Ricketts et al., 2018). Enfin, des mutations constitutives du gène *FH* (Fumarate Hydratase) sont responsables du développement de la léiomyomatose cutané-utérine avec cancer rénal (Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer, HLRCC), un syndrome héréditaire qui prédispose à des formes agressives de pRCC de type 2. Le gène *FH* code l'enzyme fumarate hydratase catalysant la conversion du fumarate en

L-malate au cours du cycle de Krebs. En conséquence, l'altération du gène *FH* conduit à l'accumulation de fumarate, lequel agit comme un inhibiteur des enzymes PHD impliquées dans la dégradation de HIF α (Hasumi & Yao, 2018).

2.3 Les carcinomes chromophobes (chRCC)

Les chRCC sont des tumeurs caractérisées par des cellules au cytoplasme clair ou éosinophile et par de multiples pertes de chromosomes incluant majoritairement les chromosomes 1, 2, 6, 10, 13 et 17. De plus, le gène *TP53* (Tumor Protein p53), localisé sur le chromosome 17 et codant la protéine p53, est muté dans 31-32% des tumeurs chRCC et constitue ainsi le gène le plus fréquemment inactivé de ce sous-type de RCC. Le gène *PTEN* arrive en deuxième position en étant muté dans 8-9% des cas de chRCC. En plus de *PTEN*, des mutations plus rares dans d'autres gènes associés à la voie PI3K-AKT-mTOR comme *TSC1* (Tuberous Sclerosis Complex subunit 1), *TSC2* (Tuberous Sclerosis Complex complex subunit 2) et *MTOR* sont également identifiées dans les chRCC. En conséquence, la voie PI3K-AKT-mTOR est globalement altérée dans environ 19% des tumeurs chRCC (Davis et al., 2014; Ricketts et al., 2018). En outre, des mutations constitutives de gènes associés à la voie PI3K-AKT-mTOR sont responsables de syndromes héréditaires prédisposant, entre autre, au chRCC : le syndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD), causé par une mutation du gène *FLCN* (Folliculin) codant la folliculine, et le syndrome de Cowden, causé par une mutation du gène *PTEN* (Hasumi & Yao, 2018; Linehan et al., 2019). Un autre type d'altération fréquente des chRCC, identifiée dans près de 20% des tumeurs, correspond à la perte d'expression de *CDKN2A* suite à la perte du chromosome 9p21.3 ou à l'hyperméthylation de son promoteur (Davis et al., 2014; Ricketts et al., 2018). Enfin, l'augmentation de l'expression du gène *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase), due à des mutations somatiques ou des réarrangements au sein de son promoteur, est retrouvée dans 17% des cas de chRCC (Davis et al., 2014; Linehan & Ricketts, 2019).

3 - Les altérations de la voie de réponse à l'hypoxie

La voie de réponse à l'hypoxie est une voie fréquemment activée dans les tumeurs solides (Dengler et al., 2014). Cette activation constitue notamment un mécanisme important de la reprogrammation du métabolisme cellulaire qui constitue l'une des caractéristiques principales

des cellules cancéreuses (Hanahan & Weinberg, 2011; Semenza, 2010). En particulier, l'activation de la voie de réponse à l'hypoxie dépendante du facteur de transcription HIF constitue l'une des voies majeures de l'oncogenèse dans les RCC (Linehan et al., 2019). Comme décrit précédemment, la dégradation des sous-unités HIF α par la protéine pVHL est un mécanisme central de l'inhibition de HIF (Dengler et al., 2014; Richard et al., 2013). La perte de fonction de pVHL induit la stabilisation et l'activation de HIF α . Cette perte de fonction, induite par différentes altérations génétiques, est un événement retrouvé dans la majorité des ccRCC (Linehan & Ricketts, 2019). L'activation de la voie de réponse à l'hypoxie n'est cependant pas une caractéristique exclusive des ccRCC et est retrouvée dans d'autres sous-types de RCC. En plus de la régulation post-traductionnelle dépendante de pVHL, le niveau d'expression des facteurs HIF α peut être régulé par la protéine mTOR impliquée dans la régulation de la traduction des protéines. En effet, la protéine mTOR est une sérine-thréonine kinase catalysant la phosphorylation activatrice de la protéine ribosomale S6 et du facteur d'initiation de la traduction eIF-4E (eukaryotic translation Initiation Factor 4E), lesquels permettent l'augmentation du taux de traduction des ARNm HIF α (Semenza, 2010). Dans ce contexte, la quantité de protéines HIF α devient supérieure à celle des enzymes PHDs responsables de l'hydroxylation nécessaire à la dégradation dépendante de pVHL, et permet ainsi la stabilisation des facteurs HIF α (Dengler et al., 2014; Semenza, 2010). L'altération de gènes codant des protéines impliquées dans la régulation de l'activation de mTOR constitue donc un autre mécanisme aboutissant à l'activation de la voie HIF. Or, la voie PI3K-AKT qui participe à la régulation de l'activation de mTOR, est souvent altérée dans les ccRCC, pRCC de ex-type I et chRCC (Ricketts et al., 2018) (**Figure 3**). L'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR est également associée à plusieurs syndromes héréditaires prédisposant au développement de RCC dont le HPRCC (gène *MET*), le syndrome de BHD (gène *FLCN*), et le syndrome de Cowden (gène *PTEN*), précédemment cités. La Sclérose Tubéreuse de Bourneville est une autre maladie héréditaire, causée par des mutations constitutionnelles des gènes *TSC1* et *TSC2*, prédisposant au développement de tumeurs bénignes du rein ainsi qu'à différents types de RCC dans certains cas (Hasumi & Yao, 2018; Linehan et al., 2019).

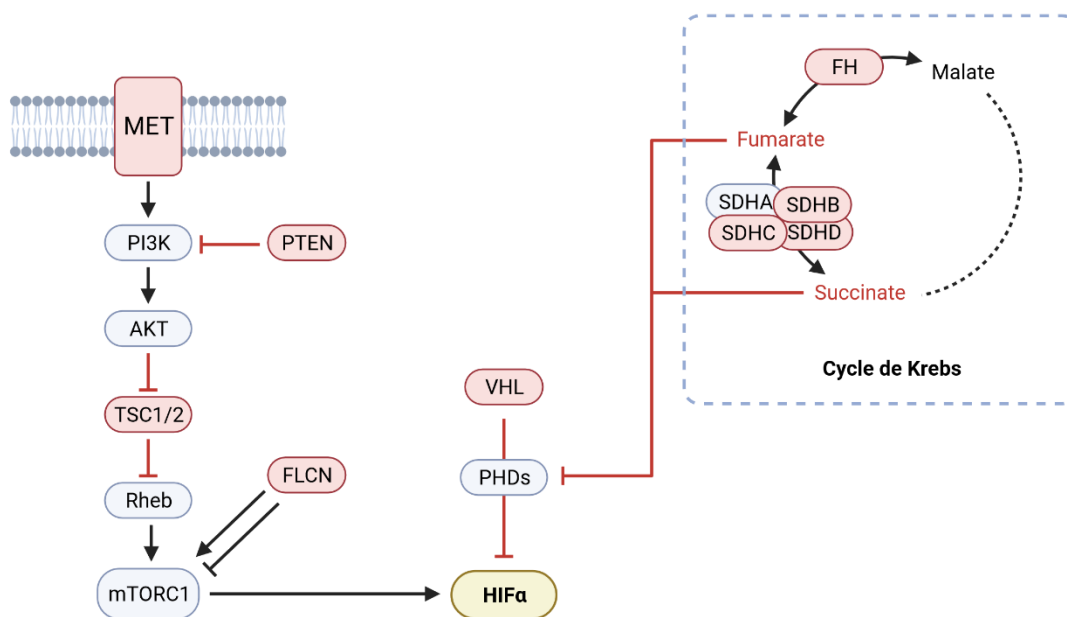


Figure 3 : Altérations génétiques et voies de signalisation associées à l'activation de HIFα dans les RCC.

Les mutations inactivatrices de VHL induisent l'activation de HIFα dans les ccRCC. Dans la majorité des RCC, cette activation est également induite par les altérations de la voie PI3K/AKT/mTOR (altérations génétiques de MET, PTEN, TSC1/2, FLCN) et du cycle de Krebs (altérations génétiques de FH, SDHB/C/D). Figure adaptée de (Linehan et al., 2019).

D'autre part, le métabolisme mitochondrial et en particulier le cycle de Krebs, fréquemment altérés dans les RCC, favorisent l'activation de la voie HIF. En effet, la dérégulation du cycle de Krebs et l'accumulation de certains métabolites, comme le succinate ou le fumarate, participe à l'activation de la voie HIF. A l'inverse, l'activation de la voie HIF participe à la reprogrammation du métabolisme cellulaire, caractérisée par l'augmentation de la glycolyse (Linehan et al., 2019). Ce mécanisme est notamment retrouvé dans deux syndromes héréditaires de prédisposition au RCC : la léiomyomatose cutané-utérine avec cancer rénal (Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer, HLRCC), et le syndrome familial associé à un défaut des enzymes succinate dehydrogénases (Succinate Dehydrogenase, SDH) (Hasumi & Yao, 2018). Comme décrit précédemment, la HLRCC est causée par une mutation constitutive du gène *FH* codant l'enzyme fumarate hydratase. L'altération du gène *FH* conduit ainsi à une accumulation du fumarate, lequel inhibe les enzymes PHD, impliquées dans la dégradation de HIFα (**Figure 3**). Comme son nom l'indique, le syndrome familial associé à un défaut des enzymes SDH est,

quant à lui, causé par une altération des gènes codant les enzymes du complexe tétramérique SDH, majoritairement *SDHB*, *SDHC* ou *SDHD*. Les enzymes SDH catalysent la conversion du succinate en fumarate au cours du cycle de Krebs. Ainsi, la perte de fonction de ces enzymes induit l'accumulation de succinate, lequel exerce une fonction d'inhibition des PHD de manière similaire au fumarate (Hasumi & Yao, 2018; Linehan et al., 2019; Semenza, 2010) **(Figure 3)**.

Enfin, bien que de nombreuses études portant sur les RCC soient focalisées sur les régulations traductionnelles et post-traductionnelles du niveau d'expression des gènes codant les facteurs de transcription HIF α , il est important de signaler que des mécanismes de régulation transcriptionnelle de ces gènes existent également. Cette régulation transcriptionnelle est, par exemple, illustrée par l'augmentation de la quantité des ARNm *HIF2 α* au cours du développement embryonnaire dans le tissu pulmonaire chez la souris (Ema et al., 1997). Différents mécanismes semblent pouvoir permettre ce type de régulation transcriptionnelle. En effet, les promoteurs des gènes *HIF1 α* et *HIF2 α* contiennent des régions riches en îlots CpG, lesquels constituent des éléments de régulation de la transcription de l'ADN en fonction de leur statut de méthylation (Kristan et al., 2021; Kunej, 2021). D'autre part, la transcription des gènes *HIF1 α* et *HIF2 α* peut être régulée par des facteurs de transcription tel que NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) (Li et al., 2020; Rius et al., 2008). Finalement, les transcrits *HIF1 α* et *HIF2 α* peuvent être ciblés par de nombreux microARN, des ARN non codants impliqués dans la dégradation des ARNm (Kristan et al., 2021; Kunej, 2021). Quelques études mettent ainsi en évidence un rôle de ces mécanismes de régulation transcriptionnelle des gènes HIF α dans le fonctionnement des cellules cancéreuses. Par exemple, la régulation de la méthylation du promoteur de *HIF2 α* impacte son niveau d'expression dans les cellules MDA-MB-468 issues de cancer du sein (Cui et al., 2016) tandis que l'augmentation du niveau de transcription de *HIF2 α* dépendante de NF- κ B favorise la migration de différentes cellules issues de RCC (Li et al., 2020).

II Voies de réponse aux dommages de l'ADN

Les voies de réponse aux dommages de l'ADN (DNA Damage Response, DDR) constituent l'ensemble des voies participant à la signalisation et à la réparation des dommages de l'ADN. Les voies de la DDR jouent un rôle essentiel dans la préservation de l'intégrité du génome en évitant la perte ou la modification d'informations génétiques pouvant résulter de l'accumulation de dommages non résolus. Des défaillances des voies de réparation des dommages de l'ADN peuvent aboutir à l'insertion et la transmission de mutations et favorisent l'émergence de cellules cancéreuses. En conséquence, les mécanismes de réparation sont finement régulés par un réseau complexe de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation (Blackford & Jackson, 2017; Chatterjee & Walker, 2017; Ciccia & Elledge, 2010). Dans cette introduction, je me focaliserai sur les mécanismes et voies de signalisation de la DDR décrites chez les vertébrés.

1 - Mécanismes de réparation des dommages de l'ADN

Les mécanismes de réparation sont multiples, complexes et dépendent du type de dommage occasionné à l'ADN. Ces derniers peuvent être classés en deux grandes catégories : les dommages issus de sources endogènes et les dommages issus de sources exogènes. Les premiers résultent en partie de réactions hydrolytiques entre l'ADN et l'eau présente dans les cellules, de méthylations spontanées non-enzymatiques de l'ADN, et de réactions chimiques entre l'ADN et des produits du métabolisme cellulaire comme les dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) ou les agents alkylants endogènes (Chatterjee & Walker, 2017; Lindahl & Barnes, 2000). Ces réactions peuvent induire différents types de dommages dont des interconversions de bases résultantes de la déamination, des pertes de bases résultantes de la dépurination, des modifications de bases (ex : méthylation, oxydation) ainsi que des cassures de l'ADN. Une part des dommages endogènes résulte également de réactions enzymatiques physiologiques comme les substitutions, insertions et délétions occasionnellement introduites par les ADN polymérases (Pol) δ et ϵ au cours de la réplication ou comme les cassures de l'ADN provoquées par la terminaison précoce de l'activité des topoisomérases I et II (Chatterjee & Walker, 2017; Iyama & Wilson, 2013). Les dommages exogènes sont, quant à eux, provoqués par des agents environnementaux physiques, tels que les rayons ultra-violet (Ultraviolet, UV)

et les radiations ionisantes (Ionizing Radiation, IR), ou chimiques. Les UV provenant de la lumière du soleil induisent majoritairement des liaisons intra-brins et des adduits de l'ADN tandis que les IR provenant, par exemple, des radiations cosmiques ou des rayons X, génèrent différents types de dommages dont des cassures simple brin (Single Strand Break, SSB) et double brin (Double Strand Break, DSB) de l'ADN. Les agents chimiques sont retrouvés dans de multiples sources exogènes et induisent différents types de dommages de l'ADN. Cette catégorie inclue notamment les agents de pontage comme la mitomycine C (MMC), le cisplatine ou le psoralène, lesquels induisent des liaisons intra-brin et inter-brins (ICLs) de l'ADN (Chatterjee & Walker, 2017; Ciccia & Elledge, 2010; Hoeijmakers, 2001).

La diversité des dommages de l'ADN est associée à une diversité des mécanismes de réparation, chacun étant spécifique d'une catégorie de lésion (**Figure 4**). Les dommages de l'ADN induisant une faible distorsion de l'hélice double brin, tels que la déamination, l'oxydation ou la perte de bases, sont réparés par le mécanisme de réparation par excision de base (Base Excision Repair, BER). Les lésions de bases plus volumineuses et complexes, telles que les liaisons intra-brins ou les adduits de l'ADN, sont réparées par le mécanisme d'excision de nucléotide (Nucleotide Excision Repair, NER). Les mésappariements de bases et les SSBs sont, quant à eux, respectivement réparés par les mécanismes spécifiques du « Mismatch Repair » (MMR) et du « Single Strand Breaks Repair » (SSBR) (Chatterjee & Walker, 2017; Hoeijmakers, 2001; Iyama & Wilson, 2013). Enfin, les mécanismes de réparation des DSBs et des ICLs directement en lien avec mon sujet de thèse seront plus précisément détaillés dans cette introduction.

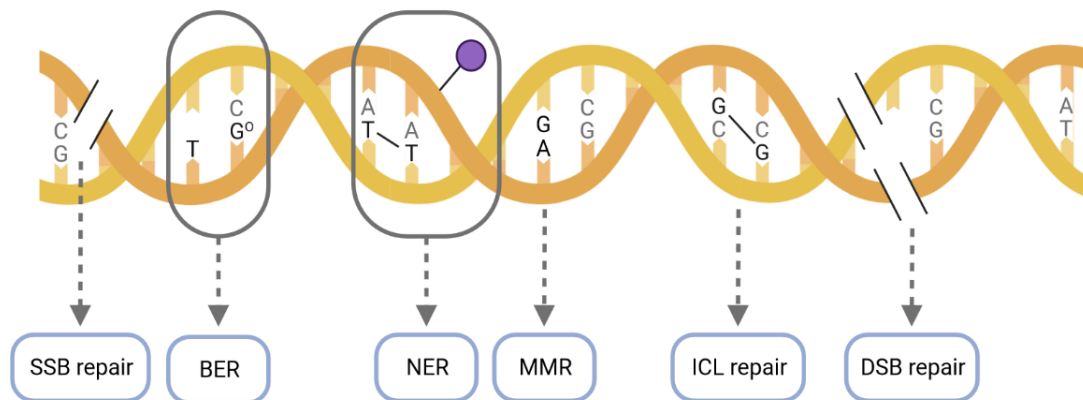


Figure 4 : Dommages de l'ADN et mécanismes de réparation associés.

Différents mécanismes de réparation sont activés en fonction du type de dommage de l'ADN. Les cassures simple brin (SSBs), mésappariements de bases (MMR), liaisons interbrins (ICLs) et cassures double brin (DSBs) sont réparés par des mécanismes spécifiques. Les dommages induisant une faible distorsion de l'hélice ADN comme l'oxydation ou la perte de bases sont réparés par le mécanisme BER. Les lésions de bases plus volumineuses et complexes comme les liaisons intra-brins ou les adduits de l'ADN sont réparées par le mécanisme NER. La sphère violette représente un adduit de l'ADN. G^o : 8-oxoguanine issue de l'oxydation. Adapté de (Hoeijmakers, 2001).

1.1 La réparation des cassures double brin (DSBs)

Les DSBs sont induits par de nombreuses sources endogènes ou exogènes. Les DSBs endogènes peuvent ainsi être générés suite à la réplication de régions d'ADN contenant initialement des SSBs induits par les produits du métabolisme comme les ROS. Des DSBs se forment également naturellement comme intermédiaires au cours de la recombinaison V(D)J, un processus intervenant dans la génération de la diversité des anticorps et récepteurs aux lymphocytes T, et au cours de la méiose. De plus, les DSBs sont générés lors de l'exposition des cellules à différents agents exogènes comme les IR ou des traitements chimiques (Iyama & Wilson, 2013; Jackson & Bartek, 2009).

Les deux principaux mécanismes de réparation des DSBs sont la réparation par recombinaison homologue (Homologous Recombination, HR) et la réparation classique de ligation d'extrémités non homologues (classical Non-Homologous End Joining, c-NHEJ). En complément des mécanismes HR et c-NHEJ, les mécanismes alternatifs identifiés comme la

ligation alternative (alternative End Joining, alt-EJ) et l'hybridation simple brin (Single-Strand Annealing, SSA) peuvent également intervenir dans la réparation des DSBs (Ceccaldi et al., 2016; Chang et al., 2017).

1.1.1 La réparation par recombinaison homologue (HR)

Le mécanisme HR nécessite une matrice d'ADN homologue à la région endommagée et intervient donc exclusivement au cours des phases S et G2 lorsque les chromosomes existent sous forme de paires. En raison de cette dépendance à la matrice constituée par le chromosome homologue, le mécanisme HR est un mécanisme de réparation exact et fidèle, prévenant la perte de l'information génétique (Chatterjee & Walker, 2017; Iyama & Wilson, 2013).

Le mécanisme HR est initié par la reconnaissance du DSB par le complexe MRN constitué de la nucléase MRE11 (MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease), de l'ATPase RAD50 (RAD50 Homolog, Double Strand Break Repair Protein) et de NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome 1). Ce complexe joue un rôle essentiel dans l'initiation de la résection en 5' de l'ADN autour de la coupure, nécessaire à la révélation des séquences d'homologie. En effet, la nucléase MRE11 s'associe avec l'endonucléase CtIP (Carboxy-terminal binding protein (CtBP)-Interacting Protein) pour amorcer la résection des extrémités double brin (Reginato & Cejka, 2020; Sartori et al., 2007) (**Figure 5**). Cette résection est prolongée par l'exonucléase 1 (Exonuclease 1, EXO1) ou la nucléase/hélicase DNA2 (DNA Replication Helicase/Nuclease 2) en association avec les hélicases BLM (Bloom helicase) ou WRN (Werner helicase/nuclease) (Nimonkar et al., 2011; Sturzenegger et al., 2014). Les séquences d'ADN simple brin protubérantes en 3' ainsi générées sont recouvertes par RPA (Replication Protein A), laquelle protège les extrémités d'ADN simple brin de la dégradation et prévient la formation de structure secondaires. L'étape suivante dépend de la protéine BRCA2 (Breast Cancer 2), indirectement recrutée par sa protéine partenaire PALB2 (Partner And Localizer of BRCA2). Bien que des mécanismes alternatifs soient décrits, le recrutement de PALB2 dépend classiquement de son interaction avec la protéine BRCA1 (Breast Cancer 1). Une fois localisée au niveau du DSB, BRCA2 induit le déplacement et remplacement de RPA par la protéine RAD51 (RAD51 Recombinase) (Foo & Xia, 2022; Jensen et al., 2010; F. Zhang et al., 2009).

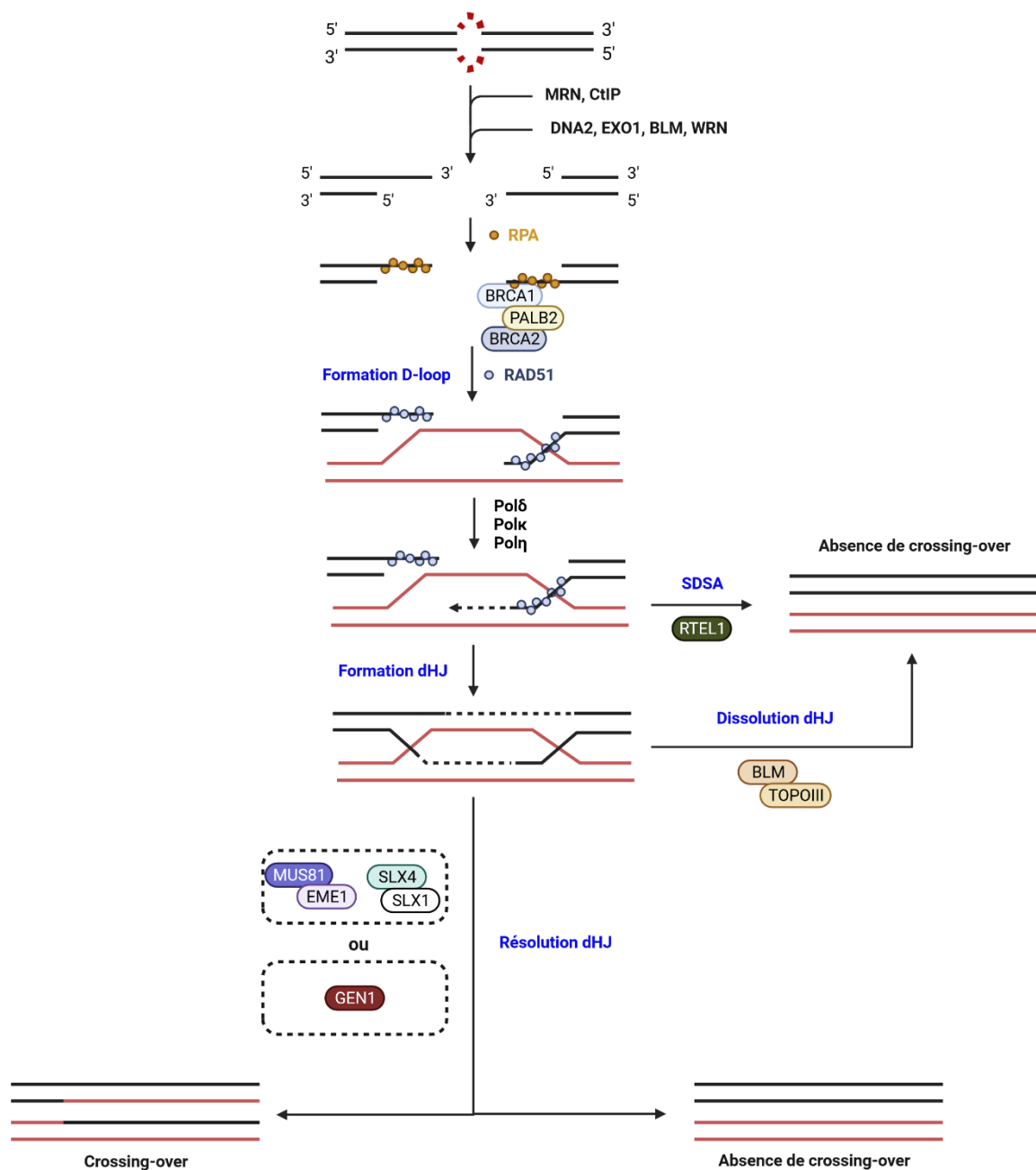


Figure 5 : Mécanisme de réparation des DSBs par HR.

Le complexe MRN est recruté au niveau du DSB et initie la résection des extrémités 5' en association avec CtIP. La résection est prolongée par EXO1 ou la DNA2 en association avec BLM ou WRN. RPA recouvre temporairement les extrémités d'ADN simple brin protubérantes en 3' et les protège de la dégradation. BRCA1 recrute BRCA2 via son interaction avec PALB2 et BRCA2 induit le remplacement de RPA par RAD51. L'ADN simple brin recouvert par RAD51 acquiert ainsi la capacité d'envahir la matrice d'ADN double brin du chromosome homologue, induisant son ouverture et la formation de la « D-loop ». La prolongation de l'ADN simple brin est réalisée par les ADN polymérases Pol δ , Pol κ et Pol η en utilisant la séquence du chromosome homologue

comme modèle. L'étape finale de la réparation par HR inclue deux mécanismes possibles. La dissolution de la « D-loop » selon le mécanisme SDSA dépend de RTEL1 et aboutit à une réparation sans crossing-over. Alternativement, la « D-loop » est prolongée en une double jonction Holliday (dHJ). La dissolution de la dHJ par le complexe BLM-TOPOIII aboutit à une réparation sans crossing-over tandis que le clivage de la dHJ par les nucléases GEN1 ou MUS81-EME1 associée à SLX4-SLX1 aboutit à une réparation avec ou sans crossing-over. Figure inspirée de (Ceccaldi et al., 2016; Ciccia & Elledge, 2010).

L'extrémité d'ADN simple brin protubérante en 3' ainsi associée à RAD51 acquière la capacité d'envahir l'ADN double brin correspondant à la matrice d'homologie, aboutissant à la formation d'une structure qualifiée de « D-loop ». La re-synthétisation de la séquence d'ADN simple brin est ensuite réalisée par l'ADN polymérase répllicative Pol δ et les ADN polymérases translésionnelles Pol κ et Pol η en utilisant la séquence du chromosome homologue comme modèle (Chatterjee & Walker, 2017; Sebesta et al., 2013). L'étape finale de la réparation par HR inclue deux mécanismes possibles. Le premier mécanisme est le « synthesis-dependent strand annealing » (SDSA) et correspond à la résolution par dissolution de la D-loop. Dans cette configuration, l'hélicase RTEL1 (Regulator Of Telomere Elongation Helicase 1) induit la dissociation de l'hybridation entre l'extrémité d'ADN simple brin prolongée par les ADN polymérases et le brin appartenant au chromosome homologue. L'extrémité simple brin libérée de la D-loop se re-hybride ainsi à son brin complémentaire sans crossing-over (Barber et al., 2008; Chatterjee & Walker, 2017; Iyama & Wilson, 2013). Le mécanisme alternatif au SDSA implique la formation de double jonctions Holliday (double Holliday Junction, dHJ) par l'hybridation du second brin d'ADN protubérant en 3' à la matrice correspondant au chromosome homologue. Dans cette configuration, les dHJ sont dissociées par le complexe constitué de l'hélicase BLM et de la topoisomérase 3 α (TOPOIII) ou clivées par l'endonucléases GEN1 (Flap Endonuclease GEN Homolog 1) ou SLX4/SLX1 (SLX4 Structure-Specific Endonuclease Subunit) (SLX1 Structure-Specific Endonuclease Subunit) et MUS81-EME1 (MUS81 Structure-Specific Endonuclease Subunit) (Essential Meiotic Structure-Specific Endonuclease 1) (Ip et al., 2008; Svendsen et al., 2009; L. Wu & Hickson, 2003). En fonction de la configuration, l'élimination des dHJ aboutit à une réparation des DSBs avec ou sans crossing-over (Ciccia & Elledge, 2010; West et al., 2015) **(Figure 5)**.

1.1.2 La ligation classique d'extrémités sans matrice d'homologie (c-NHEJ)

Comme son nom l'indique, le c-NHEJ est un mécanisme permettant la réparation de l'ADN sans matrice d'homologie. Cette caractéristique du c-NHEJ constitue à la fois son principal avantage et son principal inconvénient : sans nécessité de matrice de réparation, le c-NHEJ est activable tout au long du cycle cellulaire mais favorise le risque d'erreur de réparation pouvant conduire à une perte de l'information génétique. En conséquence, le mécanisme HR tend à être privilégié au cours des phases S et G2 tandis que le c-NHEJ intervient principalement au cours de la phase G1 (Ceccaldi et al., 2016; Iyama & Wilson, 2013).

Au cours du c-NHEJ, le DSB est premièrement reconnu par l'hétérodimère Ku70-Ku80 (Ku), capable de se lier aux extrémités d'ADN double brin et d'en inhiber la résection (Mimori & Hardin, 1986). Le complexe Ku initie également le recrutement des autres protéines impliquées dans le mécanisme c-NHEJ (Pannunzio et al., 2018; Stinson & Loparo, 2021). Un facteur important du processus de réparation par le c-NHEJ est la variabilité de configurations présentes au niveau des DSBs, lesquelles incluent les coupures avec des extrémités franches, protubérantes en 5' ou en 3', pouvant être initialement compatibles ou incompatibles. En conséquence, le c-NHEJ est un mécanisme flexible, permettant l'intervention de différentes enzymes capables d'agir sur différents types de substrats d'ADN (**Figure 6**) (Chatterjee & Walker, 2017; Iyama & Wilson, 2013; Pannunzio et al., 2018; Stinson & Loparo, 2021). Certaines étapes du c-NHEJ demeurent toutefois essentielles indépendamment de la configuration du DSB. Ainsi, la ligation nécessite invariablement le rapprochement et l'alignement des extrémités d'ADN de part et d'autre de la coupure. La formation de cette structure synaptique dépend de plusieurs protéines dont XLF (XRCC4-Like Factor) et PAXX (Paralogue of XRCC4 and XLF), recrutées sous formes d'homodimères par le complexe Ku (Stinson & Loparo, 2021; J. L. Wang et al., 2018; Zhao, Watanabe, et al., 2019). Un autre facteur essentiel du c-NHEJ est le complexe constitué de l'ADN ligase IV (LIG4) associée à sa protéine partenaire XRCC4 (X-ray Repair Cross-Complementing protein 4). En effet, le complexe LIG4-XRCC4, recruté par le complexe Ku, participe au rapprochement initial des extrémités et catalyse la ligation au cours de l'étape finale du c-NHEJ (Grawunder et al., 1997; J. L. Wang et al., 2018; Zhao, Watanabe, et al., 2019) (**Figure 6**).

Dans le cas d'un DSB asymétrique avec des extrémités incompatibles, le c-NHEJ nécessite une modification préalable des extrémités permettant d'exposer des régions de microhomologie (≤ 4 nucléotides). Les enzymes impliquées dans ce processus incluent notamment des nucléases et polymérases (Pannunzio et al., 2018; Stinson & Loparo, 2021). Ku interagit avec la sous-unité catalytique de l'ADN protéine kinase DNA-PK (DNA-dependant Protein Kinase catalytic subunit, DNA-PKcs) pour former l'enzyme DNA-PK complète (Chang et al., 2017; Jette & Lees-Miller, 2015). Cette étape induit en particulier le recrutement de la nucléase SNM1C/Artemis (Sensitive to Nitrogen Mustard 1), laquelle interagit avec la DNA-PKcs (Ma et al., 2002). L'interaction avec la DNA-PKcs induit l'acquisition par Artemis d'une activité endonucléase selon un mécanisme proposé comme double : (i) la phosphorylation d'Artemis par la DNA-PKcs permet de lever l'auto-inhibition d'Artemis et (ii) l'autophosphorylation de la DNA-PKcs induit un changement de conformation permettant une structuration de l'ADN favorable pour l'activité d'Artemis (Goodarzi et al., 2006; Niewolik et al., 2006). L'activité endonucléase d'Artemis catalyse l'élimination des régions d'ADN simple brin protubérantes en 5' et en 3' de façon à créer des extrémités compatibles pour la ligation par le complexe LIG4-XRCC4 (**Figure 6**). Artemis joue donc un rôle important dans la réparation des DSBs par le c-NHEJ. Néanmoins, cette fonction n'est pas ubiquitaire puisque seulement 10-20% des DSBs nécessitent l'intervention d'Artemis (Darroudi et al., 2007; Riballo et al., 2004).

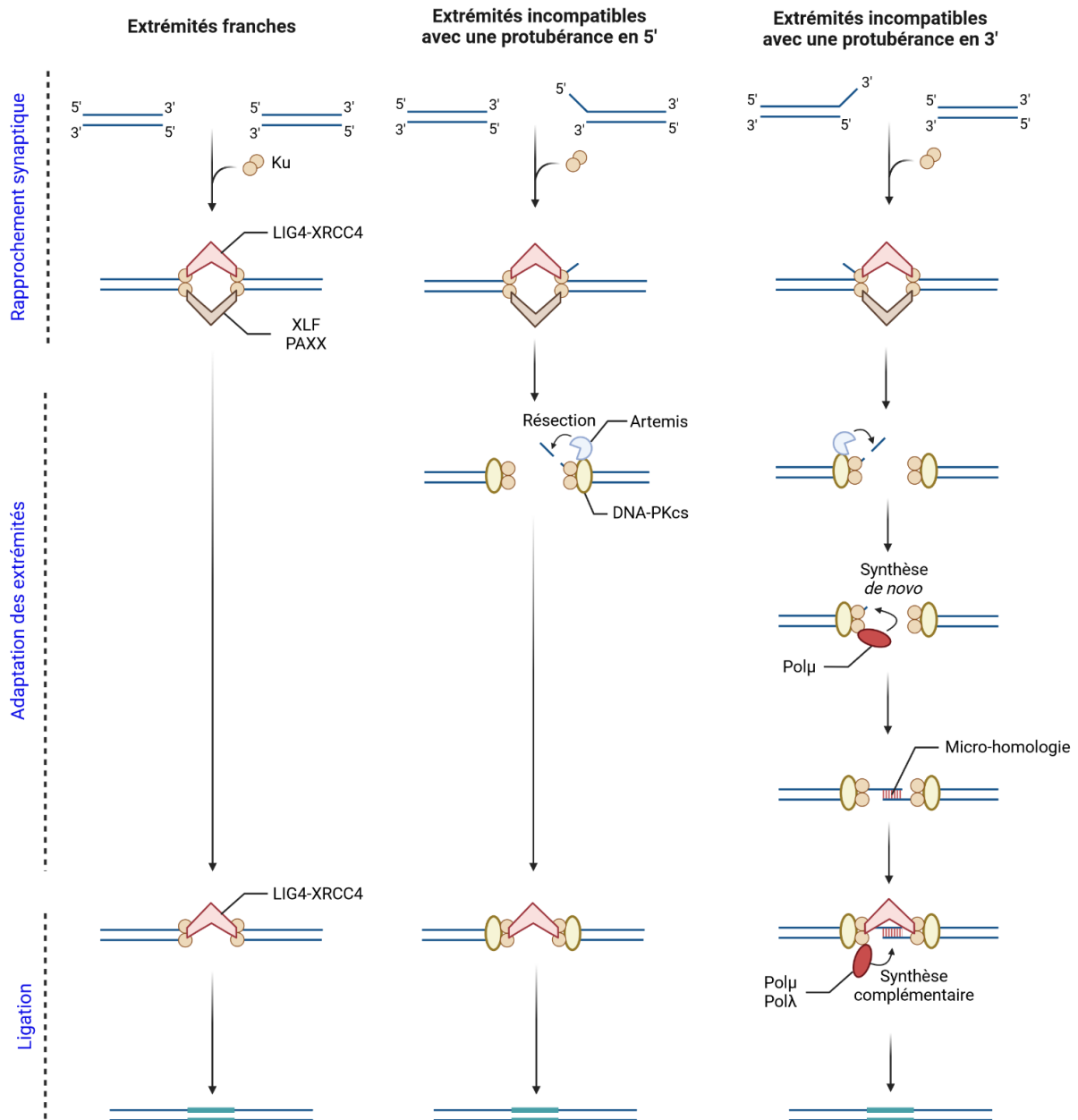


Figure 6 : Mécanisme du c-NHEJ dans la réparation des DSBs avec différentes configurations.

Le complexe Ku (Ku70-Ku80) se lie à l'ADN au niveau des DSBs et initie la réparation par le c-NHEJ. Le complexe LIG4-XRCC4 et les protéines XLF et PAXX induisent le rapprochement spatial des extrémités. L'ensemble de ces protéines constituent les facteurs essentiels du c-NHEJ et sont suffisantes pour permettre la ligation d'extrémités d'ADN double brin initialement compatibles telles que les extrémités franches. Les autres protéines sont impliquées dans le remodelage des extrémités et ne sont donc pas systématiquement nécessaires à la réparation. La DNA-PKcs interagit avec le complexe Ku et induit le recrutement et l'activation de l'activité endonucléase d'Artemis. Celle-ci participe au remodelage des extrémités incompatibles en catalysant le clivage

des extrémités d'ADN double brin protubérantes en 5' ou en 3'. La polymérase Polμ intervient également dans le processus de remodelage des extrémités incompatibles grâce à son activité de synthèse de nucléotides de novo à partir des extrémités protubérantes en 3'. Le complexe LIG4-XRCC4 catalyse la ligation finale des extrémités compatibles. Dans le cas de l'hybridation entre régions de micro-homologie, les polymérase Polλ ou Polμ participent à la ligation optimale des extrémités en catalysant la synthèse complémentaire des séquences manquantes. Figure inspirée de (Chang et al., 2017).

A l'inverse de la modification par élimination de nucléotides, les extrémités des DSBs sont également adaptables par ajout de nucléotides. Cette synthèse dépend des ADN polymérases Polμ et Polλ recrutées par le complexe Ku. Chacune de ces polymérases possède la capacité d'ajouter des nucléotides dépendamment ou indépendamment de la séquence ADN matrice du brin complémentaire. La synthèse en absence de matrice est cependant réalisée plus efficacement par Polμ. En conséquence, Polμ favorise la ligation d'extrémités incompatibles avec une protubérance en 3' en générant des régions de micro-homologie par synthèse *de novo* (Andrade et al., 2009; Gu et al., 2007; Nick McElhinny et al., 2005). De plus, Polλ et Polμ favorisent la ligation optimale d'extrémités partiellement hybridées par des régions de micro-homologie en complétant les espacements résiduels (Nick McElhinny et al., 2005; Pryor et al., 2015) (**Figure 6**).

1.1.3 La ligation alternative (alt-EJ) et l'hybridation simple brin (SSA)

Dans certaines circonstances, notamment lorsque les mécanismes HR ou c-NHEJ sont compromis, la ligation des extrémités des DSBs dépend des mécanismes alternatifs du alt-EJ ou du SSA. De manière similaire à la réparation HR, ces deux mécanismes nécessitent la résection des extrémités d'ADN de manière à exposer des régions d'homologie comprises entre 2bp et 20pb pour l'alt-EJ et au moins 20pb pour le SSA (**Figure 7**). Cependant, à la différence des réparations médiées par HR ou c-NHEJ, l'alt-EJ et le SSA sont considérés comme des mécanismes de réparation largement délétères pour le maintien de l'intégrité génomique en raison des fréquentes délétions et/ou insertions inhérentes à ces mécanismes (Ceccaldi et al., 2016; Chang et al., 2017).

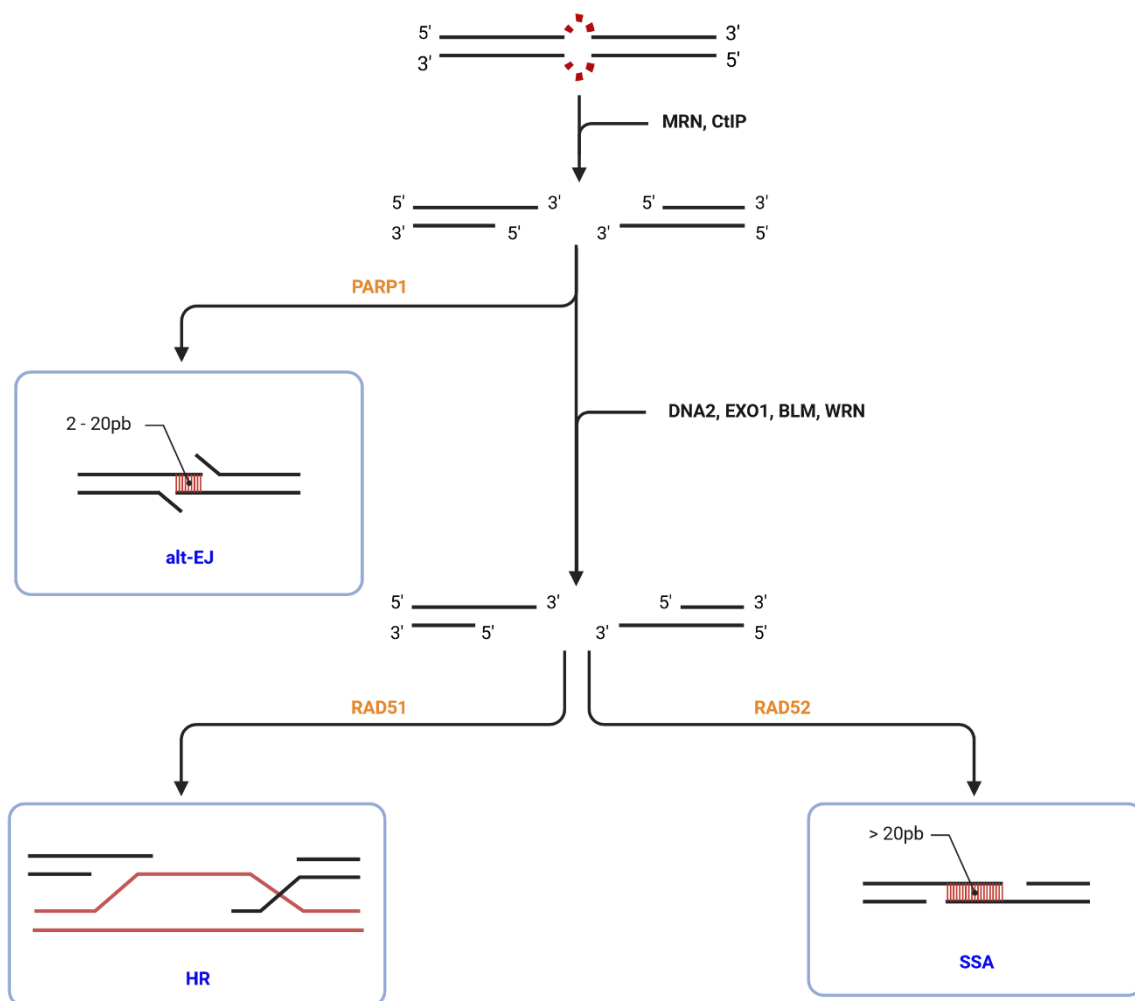


Figure 7 : Points communs et différences entre les mécanismes HR, alt-EJ et SSA.

Les mécanismes HR, alt-EJ et SSA nécessitent la résection en 5' des extrémités des DSBs catalysée par la nucléase MRE11 en association avec CtIP. L'alt-EJ dépend du recrutement de PARP1 et nécessite l'exposition de régions de micro-homologie (2-20pb). Les mécanismes HR et SSA nécessitent la digestion en 5' extensive des extrémités par l'exonucléase EXO1 ou la nucléase/hélicase DNA2 en association avec les hélicases BLM ou WRN. Le SSA dépend du recrutement de RAD52 et nécessite l'exposition de régions d'homologie supérieures à 20pb. Le mécanisme HR dépend du recrutement de RAD51 et nécessite la présence du chromosome homologue. Figure inspirée de (Ceccaldi et al., 2016; Chang et al., 2017).

L'initiation du alt-EJ dépend de la reconnaissance de la lésion par la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1, PARP1), laquelle entre en compétition avec Ku pour la liaison des extrémités des DSBs et favorise l'alt-EJ aux dépens du c-NHEJ (Beck et al., 2014; Chang et al., 2017; M. Wang et al., 2006) (**Figure 7**). En particulier, PARP1 semble médier

le recrutement du complexe MRN au niveau des DSBs (Haince et al., 2008). Tout comme pour le mécanisme HR, la résection en 5' des extrémités des DSBs est catalysée par la nucléase MRE11 en association avec CtIP (Ceccaldi et al., 2016; Chang et al., 2017). La polymérase Pol θ stabilise l'hybridation entre les régions d'homologie exposées sur les extrémités 3' opposées et prolonge les séquences en utilisant le brin complémentaire comme modèle. De plus, Pol θ possède la capacité d'ajouter des nucléotides pour générer des régions de micro-homologie, aboutissant à des insertions occasionnelles > 10pb au cours de la réparation (Kent et al., 2016; Wyatt et al., 2016). A l'inverse, en cas d'hybridation de régions de micro-homologie localisées à distance des extrémités, les régions non-homologues terminales en 3' sont éliminées préalablement à l'élongation dépendante de Pol θ . Les nucléases impliquées dans cette étape ne sont actuellement pas caractérisées (Chang et al., 2017). L'alt-EJ aboutit donc fréquemment à des insertions et des délétions au sein de la séquence réparée et explique l'origine du manque de fidélité de ce mécanisme. Finalement, les différents fragments sont liés et scellés par l'ADN ligase I ou l'ADN ligase III (Ceccaldi et al., 2016; Chang et al., 2017).

Le SSA nécessite l'exposition de régions d'homologie d'au moins 20pb et se différencie donc du mécanisme alt-EJ par une étape de résection plus conséquente. Dans ce contexte, de la même manière que pour le mécanisme HR, la protubérance en 3' générée par le complexe MRN en association avec CtIP et prolongée par l'exonucléase EXO1 ou la nucléase/hélicase DNA2 en association avec les hélicases BLM ou WRN. La longue protubérance en 3' est également recouverte et protégée par RPA. En revanche, à la différence de la réparation par HR, le SSA ne nécessite pas la présence du chromosome homologue servant de matrice d'homologie pour la réparation du brin endommagé (Ceccaldi et al., 2016; Chang et al., 2017). Le SSA est donc un mécanisme indépendant de l'action d'invasion de la séquence matrice médiée par RAD51. Dans ce contexte, l'hybridation des brins opposés d'ADN est médiée par le protéine RAD52 (RAD52 Homolog, DNA Repair Protein) (Bennardo et al., 2008; Grimme et al., 2010; Stark et al., 2004) (**Figure 7**). Les régions terminales en 3' non hybridées sont excisées par le complexe d'excision des nucléotides XPF(ERCC4)-ERCC1 (Excision Repair 4, Endonuclease Catalytic Subunit) (ERCC Excision Repair 1, Endonuclease Non-Catalytic Subunit) (Bennardo et al., 2008; Motycka et al., 2004). Ainsi, tout comme l'alt-EJ, le SSA est un mécanisme

de réparation peu fidèle en raison des délétions occasionnées par l'élimination des régions non-homologues (Ceccaldi et al., 2016; Chang et al., 2017).

1.1.4 La régulation des mécanismes de réparation des DSBs

Comme décrit précédemment, l'absence ou la présence de résection en 5' des extrémités des DSBs oriente la réparation respectivement vers le c-NHEJ ou vers la HR, l'alt-EJ ou le SSA. Cette résection est en particulier contrôlée par une opposition entre le complexe Ku, inhibant la résection et favorisant le c-NHEJ, et le complexe MRN en association avec CtIP, catalysant la résection et favorisant la HR, l'alt-EJ ou le SSA (Bennardo et al., 2008; Chang et al., 2017). Le cycle cellulaire constitue un facteur déterminant de la régulation de cette opposition et favorise la résection des extrémités aux cours des phases S et G2, une régulation expliquant la prédominance du mécanisme HR en présence du chromosome homologue. Par exemple, les kinases CDKs catalysent la phosphorylation de CtIP au cours des phases S et G2. Cette phosphorylation induit la formation d'un complexe entre CtIP, MRN et BRCA1, une interaction facilitant la résection des extrémités des DSBs et contribuant à l'activation du mécanisme HR (Ceccaldi et al., 2016; Chang et al., 2017; Chen et al., 2008). De plus, CDK1 et CDK2 catalysent la phosphorylation de EXO1 au cours des phases S et G2 et cette modification post-traductionnelle est essentielle à la résection extensive des extrémités des DSBs catalysée par la nucléase (Tomimatsu et al., 2014). La résection des extrémités des DSBs est également régulée par une opposition entre la protéine BRCA1, favorisant le mécanisme HR, et la protéine 53BP1 (p53-Binding Protein 1), favorisant le mécanisme c-NHEJ (Bunting et al., 2010; Ceccaldi et al., 2016; Chang et al., 2017). L'équilibre entre BRCA1 et 53BP1 évolue en fonction du cycle cellulaire, l'action de BRCA1 étant prédominante au cours des phases S/G2 et celle de 53BP1 au cours de la phase G1. Bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas complètement définis, l'action antagoniste de 53BP1 par rapport à BRCA1 nécessite sa coopération avec la protéine RIF1 (Replication Timing Regulatory Factor 1), laquelle interagit avec la forme 53BP1 phosphorylée. Un des modèles proposés suggère que la liaison de 53BP1-RIF1 à l'ADN autour des DSBs permet le maintien d'une structure de la chromatine défavorable à l'accumulation de BRCA1 et au recrutement des nucléases impliquées dans la résection (Chapman et al., 2012; Escribano-Díaz et al., 2013).

1.2 La réparation des ICLs par la voie de FANC/BRCA

Les ICLs correspondent à la liaison covalente de deux bases situées sur les brins opposés d'ADN. Les ICLs peuvent être issus de sources endogènes, produits comme intermédiaires de différents processus métaboliques tels que le formaldéhyde ou l'acétaldéhyde, ou exogènes. Cette dernière catégorie inclue des composés chimiques génotoxiques notamment utilisés en chimiothérapie tels que les dérivés du platine (ex : le cisplatine), les psoralènes, les moutardes azotées ou encore la MMC. Les ICLs empêchent la séparation des brins nécessaire à la réplication et à la transcription de l'ADN et constituent donc des lésions particulièrement toxiques pour les cellules. Plusieurs mécanismes d'élimination des ICLs existent, associés ou non à la phase de réplication de l'ADN. En particulier, la voie de Fanconi ou voie FANC/BRCA constitue une voie majeure de réparation des ICLs au cours de la phase S et demeure la plus étudiée (Niraj et al., 2019; Renaudin & Rosselli, 2020; Semlow & Walter, 2021). La voie de FANC/BRCA constitue une voie de réparation étroitement liée à l'anémie de Fanconi, une maladie autosomique récessive rare (1/100 000 naissances) découverte en 1927 par le pédiatre Guido Fanconi. Cette maladie se caractérise par une aplasie médullaire, des malformations congénitales et une prédisposition à certains types de cancers tels que la leucémie myéloïde aigüe et des cancers de la tête et du cou, du sein, des ovaires et du pancréas. Les gènes *FANC* (Fanconi Anemia Complementation group) codant les principales protéines de la voie FANC/BRCA sont définis comme ceux dont les mutations induisent l'anémie de Fanconi. A ce jour, 22 gènes *FANC* sont caractérisés (Niraj et al., 2019; Renaudin & Rosselli, 2020).

La voie FANC/BRCA est classiquement divisée en 4 groupes fonctionnels. Le premier groupe s'articule autour de l'ATPase FANCM et inclue les trois protéines majeures d'interaction avec FANCM, c'est-à-dire FAAP24 (Fanconi-Associated Protein 24), MHF1(CENPS) (Centromere Protein S) et MHF2(CENPX) (Centromere Protein X). Ce premier groupe intervient dans la reconnaissance de l'ICL et assure le recrutement du second groupe désigné comme le complexe principal. Ce dernier constitue un large complexe E3 ubiquitine ligase incluant FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FAAP20 et FAAP100. Ce complexe recrute l'enzyme FANCT, laquelle catalyse l'ubiquitylation du troisième groupe fonctionnel, un hétérodimère constitué de FANCI et FANCD2 (ID2). La forme ubiquitylée du dimère ID2 (ID2^{Ub}) assure le recrutement du quatrième groupe correspondant aux protéines directement

en charge de la réparation de l'ADN. Ces protéines incluent FANCP (SLX4) et la nucléase FANCO (XPF)-ERCC1 en charge de l'excision de l'ICL ; des acteurs de la réparation par recombinaison homologue, FANCD1 (BRCA2), FANCO, FANCR (RAD51), FANCU, FANCN (PALB2) et FANCS (BRCA1) ; l'E3 ubiquitine ligase FANCW ; l'hélicase FANCI ; et FANCV (REV7/MAD2L2) (Mitotic Arrest Deficient 2 Like 2) qui s'associe avec REV3 pour former l'ADN polymérase translésionnelle Pol ζ (Renaudin & Rosselli, 2020; Semlow & Walter, 2021).

Trois modèles de réparation par la voie FANC/BRCA sont actuellement proposés : le modèle avec une fourche de réplication venant buter sur l'ICL, le modèle avec deux fourches venant buter sur l'ICL et le modèle translésionnel, caractérisé par la capacité de la fourche de réplication à progresser au-delà de l'ICL sans nécessité d'excision préalable (Huang et al., 2013; Räschle et al., 2008; Renaudin & Rosselli, 2020; Semlow & Walter, 2021) (**Figure 8**). Ce dernier semble constituer le modèle majoritaire de réparation des ICLs par la voie FANC/BRCA puisque la traversée de la fourche de réplication au-delà de l'ICL est retrouvée dans au moins 50% des cas dans différentes lignées cellulaires. En comparaison, les modèles de blocage d'une fourche ou deux fourches de réplication représentent respectivement environ 20% et 15% des cas de rencontres avec une ICL (Huang et al., 2013). Néanmoins, en dépit de leur différente configuration de départ, ces trois modèles présentent des étapes de réparation communes incluant l'excision de l'ICL, la synthèse translésionnelle pour la réparation du premier brin et l'activation de la réparation par HR du second brin. En particulier, suite à la traversée de l'ICL dépendante de l'activité translocase de FANCM et de son association avec MHF1/MHF2, la structure en X autour de l'ICL s'apparente à celle retrouvée dans le modèle à deux fourches de réplication et est suggéré dépendre des mêmes étapes (Huang et al., 2013; Semlow & Walter, 2021) (**Figure 8**).

Dans les modèles à une ou deux fourches de réplication, la ou les hélicase(s) CMG (CDC45-Mcm2-7-GINS) se dissocie(nt) de l'ADN en arrivant à proximité de l'ICL selon un mécanisme dépendant de son ubiquitylation tandis que dans le modèle translésionnel, la réplication de l'ADN se poursuit au-delà de l'ICL (Semlow & Walter, 2021). Par la suite, la première étape de réparation est commune à l'ensemble des modèles et consiste en l'excision de l'ICL. Cette excision permet la libération de l'un des brins d'ADN et aboutit à la génération d'un DSB

(Figure 8). XPF (FANCD1)-ERCC1 est recrutée par SLX4 (FANCD2) et apparaît comme l'endonucléase majoritaire qui catalyse l'incision du côté 5' de l'ICL selon un mécanisme nécessitant la réversion préalable de la fourche par FANCD2 de façon à générer la structure appropriée pour le clivage (Klein Douwel et al., 2014; Semlow & Walter, 2021). En revanche, l'identité de la ou des nucléase(s) additionnelle(s) permettant l'excision complète de la lésion reste à déterminer. En particulier, l'implication de SNM1A (Sensitive to Nitrogen Mustard 1A) apparaît comme une possibilité cohérente. En effet, SNM1A possède une activité exonucléase 5' vers 3' capable de dégrader un brin d'ADN contenant une ICL à partir d'une incision réalisée par XPF-ERCC1 *in vitro* (Abdullah et al., 2017; A. T. Wang et al., 2011). D'autres nucléases sont également susceptibles d'avoir un rôle redondant à celui de SNM1A. Ainsi, la possibilité d'un rôle pour l'endonucléase MUS81-EME1 est supporté par son interaction avec SLX4 (FANCD2) et le fait que la délétion de *MUS81* inhibe l'accumulation de DSBs dans des cellules souches embryonnaires de souris exposées au cisplatine (Hanada et al., 2006; Muñoz et al., 2009). Cependant, MUS81-EME1 semble principalement intervenir dans l'excision des ICLs en cas de défaillance de XPF-ERCC1 et SNM1A (A. T. Wang et al., 2011). De son côté, la nucléase FANCD2 (FANCD2 and FANCD1 Associated Nuclease 1) interagit avec la forme ubiquitinylée de FANCD2 et la déplétion de *FANCD2* induit une sensibilisation à la MMC et au cisplatine des lignées cellulaires humaines, suggérant un rôle dans la voie FANCD2/BRCA (Kratz et al., 2010; T. Liu et al., 2010). Néanmoins, les études plus récentes argumentent en faveur d'un rôle de FANCD2 indépendant du processus de réparation des ICLs par la voie FANCD2/BRCA (Klein Douwel et al., 2014; Lachaud et al., 2016).

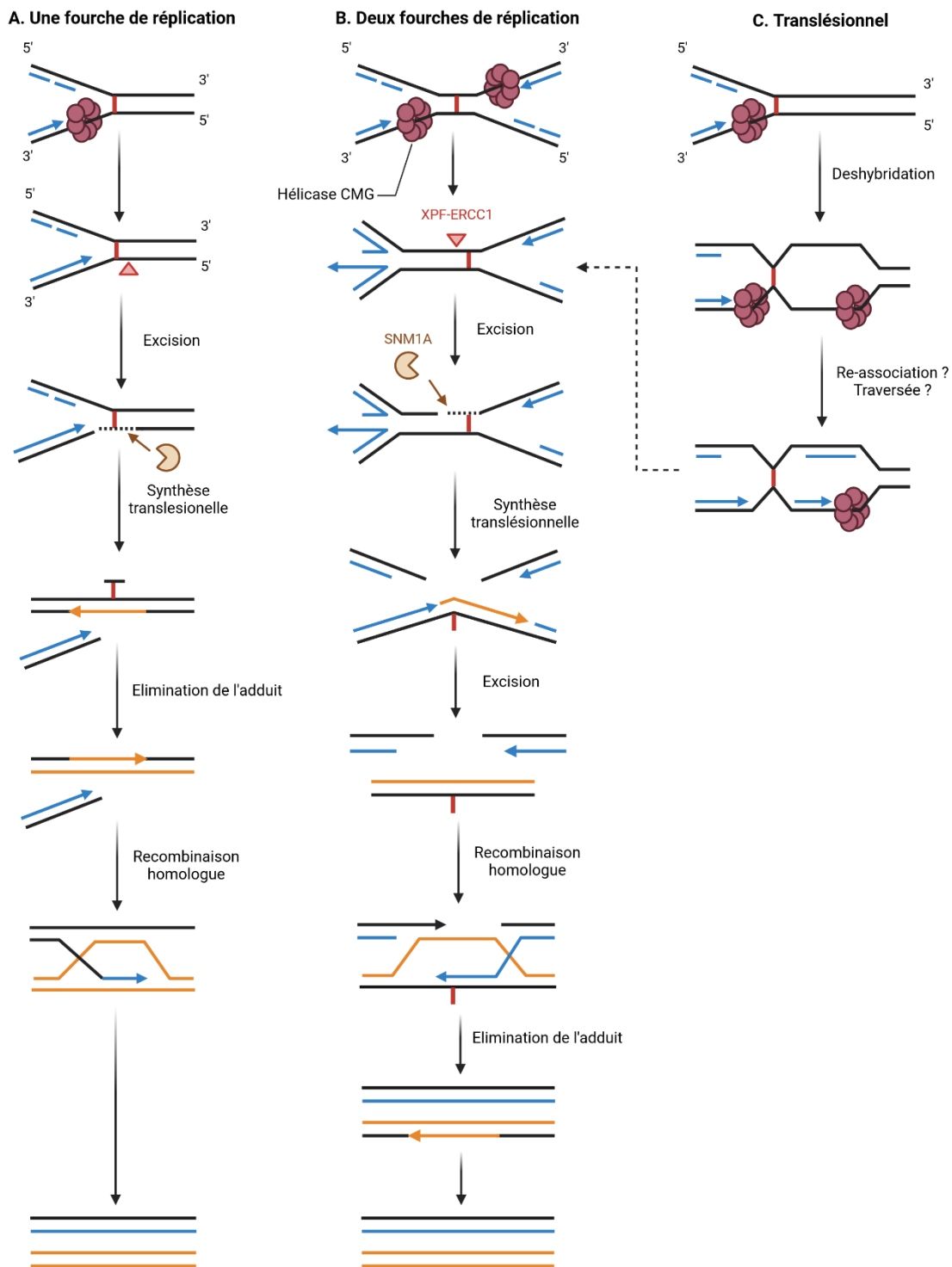


Figure 8 : Mécanismes de réparation des ICLs par la voie FANCD1/BRCA1 en fonction des différents modèles.

Trois modèles sont proposés pour la réparation des ICLs par la voie FANCD1/BRCA1 : le modèle à une fourche de réplication (A), le modèle à deux fourches de réplication (B) et le modèle

translésionnel (C). Dans les modèles A et B, la ou les hélicase(s) CMG se dissocie(nt) de l'ADN à l'approche de l'ICL. Dans le modèle C, la réplication de l'ADN reprend au-delà de l'ICL suite à la traversée ou dissociation et réassociation du complexe de réplication. Cependant, les étapes clé de la réparation sont communes aux différents modèles. L'excision de l'ICL est réalisée par une incision côté 5' par l'endonucléase XPF-ERCC1. Cette incision permet probablement la digestion de la portion d'ADN contenant l'ICL par l'exonucléase SNM1A. Suite au décrochage de l'ICL, la réplication du brin d'ADN contenant l'adduit résiduel est réalisée par les ADN polymérases translésionnelles Pol ζ et REV1. Cette chromatide sert ensuite de matrice pour la réparation du chromatide contenant un DSB par le mécanisme HR. Finalement, l'élimination définitive de l'adduit résiduel de l'ICL est réalisée par un mécanisme de réparation des nucléotides (NER ou BER) à la suite de l'intervention de Pol ζ et REV1 (illustrée dans le modèle A) ou après la réparation par le mécanisme HR (illustrée dans le modèle B). Adapté de (Semlow & Walter, 2021).

A la suite de l'excision de l'ICL, un résidu du pontage demeure attaché sous forme d'adduit à l'un des brins d'ADN. En conséquence, la poursuite de la réplication de ce brin d'ADN nécessite l'activité d'une polymérase capable de traverser l'adduit résiduel. Cette étape est réalisée par l'ADN polymérase translésionnelle Pol ζ en association avec l'ADN polymérase translésionnelle REV1 (REV1 DNA Directed Polymerase) et aboutit à la réparation de l'une des chromatide (Budzowska et al., 2015; Räschele et al., 2008). Cette chromatide est ainsi utilisée comme matrice pour la réparation du DSB de la seconde chromatide par le mécanisme HR (Renaudin & Rosselli, 2020; Semlow & Walter, 2021). Concernant l'adduit résiduel du pontage, son élimination est réalisée par un des mécanismes de réparation des nucléotides (NER ou BER) avant ou après la réparation par HR (Semlow & Walter, 2021) **(Figure 8)**.

Enfin, la voie FANC/BRCA joue un rôle général dans la réponse au stress réplcatif, c'est-à-dire l'ensemble des stress induisant un ralentissement ou un blocage de la réplication (Niraj et al., 2019). En effet, la voie FANC/BRCA est activée en réponse au stress induit par des inhibiteurs de la réplication de l'ADN et participe à la stabilisation de la fourche de réplication (Howlett et al., 2005; Lossaint et al., 2013; Schlacher et al., 2012). La voie FANC/BRCA joue également un rôle dans le maintien des sites fragiles de la réplication FRA3B et FRA16D, des régions d'ADN intrinsèquement difficiles à répliquer (Howlett et al., 2005). Les régions d'ADN non complètement répliquées, généralement les sites fragiles de la réplication, demeurent reliés par des ponts ultrafins entre les chromatides sœurs et constituent une source de cassures et d'erreur de ségrégation chromosomique. La voie FANC/BRCA participe notamment à la

résolution de ces ponts durant la phase de mitose selon un mécanisme dépendant d'une collaboration entre l'hétérodimère ID2 et l'hélicase BLM (Chan et al., 2009; Naim & Rosselli, 2009). En plus des sites fragiles de la réplication, les structures secondaires de l'ADN sont des obstacles physiques à la réplication et constituent donc une autre source de stress réplicatif endogène. Parmi ces différentes structures, les « R-loop » correspondent à l'hybridation d'un ARN à l'ADN avec déplacement du brin d'ADN complémentaire. La voie FANCD1/BRCA1 est impliquée dans la résolution des « R-loop » et cette fonction est suggérée comme déterminante dans l'émergence de l'instabilité génomique associée à la maladie de Fanconi (García-Rubio et al., 2015; Schwab et al., 2015).

2 - Les voies de signalisation des dommages de l'ADN

Les voies de signalisation des dommages de l'ADN jouent un rôle de régulation globale associée aux mécanismes de réparation. En effet, ces voies participent au recrutement et à l'activation des protéines de la réparation mais assurent également l'arrêt temporaire du cycle cellulaire nécessaire à la réparation. De plus, dans le cas d'une persistance des dommages ou d'erreurs de la réparation, les voies de signalisation assurent l'élimination des cellules fortement endommagées, potentiellement pro-tumorales, en stimulant l'activation des voies de mort cellulaire (Blackford & Jackson, 2017; Ciccio & Elledge, 2010).

2.1 Les poly(ADP-ribose) polymérases

La famille des poly(ADP-ribose) polymérases (PARP) incluent 17 membres mais seuls PARP1, PARP2 et PARP3 sont actuellement décrits comme impliqués dans la DDR. Les PARPs catalysent l'ajout de mono-ADP-riboses (Mono(ADP-ribose), MAR) ou poly-ADP-riboses (Poly(ADP-Ribose), PAR) linéaires ou ramifiés sur différents résidus incluant les sérines, glutamates ou aspartates de protéines cibles ou sur les PARPs elles-mêmes (Beck et al., 2014; Palazzo et al., 2018; Schreiber et al., 2006). PARP1, PARP2 et PARP3 peuvent également catalyser le transfert de sous-unités ADP-riboses sur l'ADN (Matta et al., 2020; Zarkovic et al., 2018).

La parylation en réponse aux SSBs et DSBs est un mécanisme favorisant la réparation. En effet, elle permet le recrutement des protéines de la réparation interagissant avec les PAR et la régulation de ces protéines par le biais de leur parylation (Beck et al., 2014; Schreiber et al., 2006). D'autre part, l'activité des PARPs induit un relâchement de la chromatine résultant de la

poly(ADP-ribosylation) des histones ainsi que du recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine tels que l'ATPase ALC1 (CHDL1) (Chromodomain Helicase/ATPase DNA-binding protein 1-Like) ou SMARCA5 (SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependant Regulator of Chromatin, subfamily A, member 5), un mécanisme favorisant l'accès des protéines de réparation aux cassures de l'ADN. Enfin, la régulation de la compaction de la chromatine par les PARPs participe à la régulation de la transcription de manière à limiter le risque d'une collision entre l'ARN polymérase et les protéines de la réparation (Caldecott, 2022; Schreiber et al., 2006; Tallis et al., 2014). Les PARPs se différencient par leurs différents rôles dans la DDR. Ainsi, PARP1 et PARP2 jouent un rôle dans la réponse aux SSBs tandis que PARP1 et PARP3 sont impliqués dans la réponse aux DSBs (Beck et al., 2014; Caldecott, 2022). Comme décrit précédemment, PARP1 joue en particulier un rôle essentiel dans l'activation de la réparation des DSBs par le mécanisme alt-EJ (Ceccaldi et al., 2016; Chang et al., 2017).

2.2 Les kinases DNA-PK, ATM et ATR

Dans les cellules humaines, trois kinases PIKKs (Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related Kinases) jouent des rôles majeurs dans la signalisation des dommages de l'ADN et la régulation de la DDR : la DNA-PKcs (DNA-dependant Protein Kinase catalytic subunit), ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia-Telangiectasia mutated and Rad3 related). La DNA-PKcs et ATM sont principalement impliquées dans la signalisation des DSBs tandis qu'ATR intervient majoritairement dans la signalisation du stress réplcatif (Blackford & Jackson, 2017; Ciccia & Elledge, 2010). Ces trois PIKKs sont composées de domaines spécifiques communs incluant un long domaine N-terminal de répétitions HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1) et un domaine sérine-thréonine kinase flanqué par un domaine FAT (FRAP, ATM, TRRAP) N-terminal et un domaine FAT C-terminal (**Figure 9**). Les PIKKs de la DDR possèdent plusieurs sites de phosphorylation et/ou autophosphorylation, principalement au niveau de sérines ou thréonines localisées en amont d'une glutamine (S/TQ) (Blackford & Jackson, 2017).

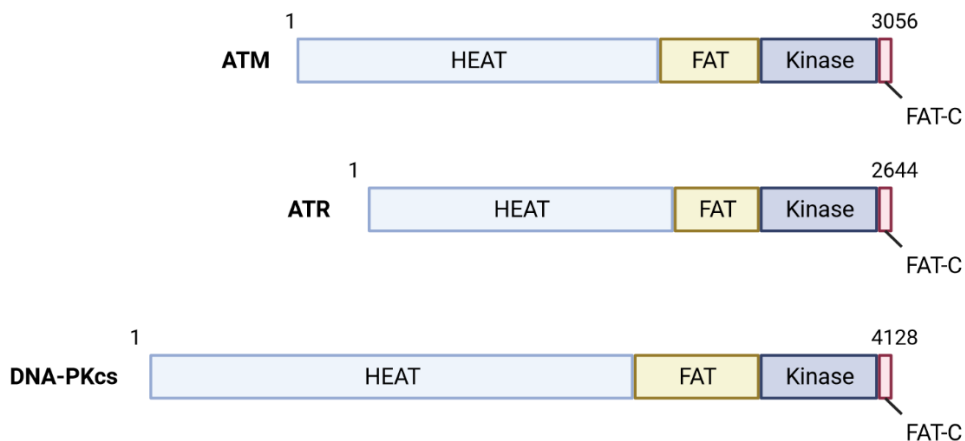


Figure 9 : Structures des kinases ATM, ATR et DNA-PKcs.

ATM, ATR et la DNA-PKcs sont membres de la famille des PIKKs et sont caractérisées par des domaines communs : le domaine N-terminal HEAT, le domaine FAT côté N-terminal, le domaine sérine-thréonine kinase et le domaine FAT côté C-terminal (FAT-C). Figure adaptée de (Blackford & Jackson, 2017).

2.2.1 La DNA-PKcs

La sous-unité catalytique de la DNA-PK (DNA-PKcs) est recrutée au niveau des DSBs par le biais de Ku80 de l'hétérodimère Ku qui interagit avec les extrémités d'ADN double brin (Falck et al., 2005; Jette & Lees-Miller, 2015). Comme décrit précédemment, l'ensemble constitué par la DNA-PKcs et Ku constitue ainsi la version complète de la DNA-PK qui joue un rôle central dans la réparation des DSBs par le mécanisme de réparation c-NHEJ (Chang et al., 2017; Pannunzio et al., 2018). Un rôle essentiel et spécifique de la DNA-PKcs est le recrutement et l'activation de la nucléase Artemis, nécessaire à la résection des extrémités DSBs asymétriques au cours du c-NHEJ (Ma et al., 2002; Pannunzio et al., 2018). En dehors de cette activité, la DNA-PKcs s'autophosphoryle et phosphoryle diverses protéines impliquées dans la réparation du c-NHEJ dont Ku70, Ku80, XRCC4 et XLF. Cependant, le rôle de la phosphorylation des protéines du c-NHEJ par la DNA-PKcs dans la réparation demeure indéterminé (Blackford & Jackson, 2017; Jette & Lees-Miller, 2015). Parmi les nombreux sites phosphorylables de la DNA-PKcs, la phosphorylation des résidus sérines et thréonines compris dans le site « ABCDE » (T2609, S2612, T2620, S2624, T2638 et T2647) permet d'induire sa dissociation de l'ADN de manière à permettre la réparation du DSB (Blackford & Jackson, 2017; Jette & Lees-Miller, 2015).

2.2.2 ATM

ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) est la kinase centrale qui active et régule la réponse globale aux DSBs. L'activation d'ATM dépend du complexe constitué de MRE11, RAD50 et NBS1 (MRN), lequel joue donc un rôle fondamental dans la réparation et dans la signalisation des DSBs. Comme décrit précédemment, la nucléase MRE11 s'associe avec l'endonucléase CtIP pour amorcer la résection des extrémités double brin nécessaire aux mécanismes HR, alt-EJ et SSA (Ceccaldi et al., 2016; Reginato & Cejka, 2020). De son côté, RAD50 agit comme une protéine de liaison interagissant à la fois avec MRE11 et les extrémités des DSBs. Finalement, NBS1 interagit avec MRE11 et médie la liaison entre MRN et d'autres protéines liées à son activité dans la DDR (Ciccia & Elledge, 2010). En particulier, NBS1 interagit avec ATM, induisant son recrutement au niveau des DSBs (Falck et al., 2005; Shiloh & Ziv, 2013). Dans les cellules non endommagées, ATM existe à l'état de dimères inactifs. L'activation d'ATM nécessite la dissociation de ces dimères en monomères par des mécanismes encore mal définis mais est caractérisée par la phosphorylation d'ATM sur plusieurs résidus, notamment la sérine 1981 (S1981) chez l'Homme (Blackford & Jackson, 2017; Shiloh & Ziv, 2013) (**Figure 10**).

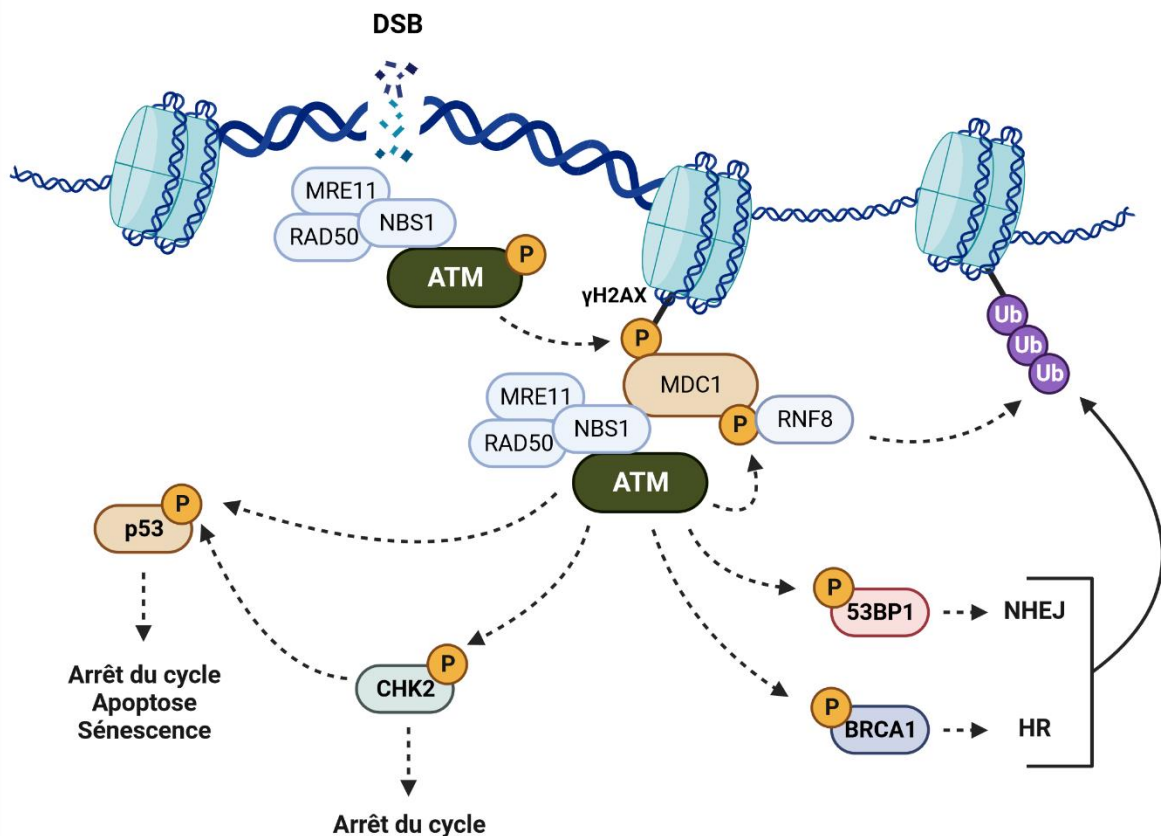


Figure 10 : La voie de signalisation ATM en réponse aux DSBs.

L'interaction entre ATM et NBS1 permet le recrutement d'ATM par le complexe MRN au niveau des DSBs. L'activation d'ATM est réalisée selon des mécanismes mal définis mais est caractérisée par la phosphorylation d'ATM. La phosphorylation des histones H2AX localisées à proximité des DSBs par ATM permet le recrutement de la protéine MDC1. Celle-ci interagit avec NBS1 et participe à amplifier le recrutement du complexe MRN et d'ATM. La forme active d'ATM catalyse la phosphorylation régulatrice de nombreux substrats impliqués dans la réparation des DSBs dont 53BP1 et BRCA1, les deux facteurs clés favorisant le c-NHEJ et la HR, respectivement. De plus, la phosphorylation de MDC1 par ATM permet le recrutement de l'ubiquitine ligase RNF8. Celle-ci initie une série d'ubiquitinylation des histones participant au recrutement de BRCA1 et 53BP1. ATM induit également l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux DSBs par la phosphorylation et activation de la kinase CHK2 et de p53. La phosphorylation de p53 par ATM peut également aboutir à l'activation de la sénescence ou de la mort cellulaire par apoptose. Figure adaptée de (Blackford & Jackson, 2017).

ATM participe au maintien et à l'amplification de son activation selon un mécanisme de rétrocontrôle positif. En effet, ATM catalyse la phosphorylation du résidu sérine 139 des histones H2AX localisées à proximité des DSBs. La forme phosphorylée de H2AX, identifiée

comme γ H2AX, recrute la protéine MDC1 (Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1), laquelle interagit avec NBS1 et ATM et participe ainsi à l'amplification de l'activation d'ATM (Blackford & Jackson, 2017; Ciccina & Elledge, 2010; Shiloh & Ziv, 2013). La forme active d'ATM catalyse la phosphorylation de nombreux substrats permettant l'organisation des différents processus cellulaires impliqués dans la réponse aux DSBs, dont la régulation des mécanismes de réparation de l'ADN. ATM catalyse notamment la phosphorylation de 53BP1 et BRCA1, les deux facteurs clés favorisant respectivement le c-NHEJ et la HR, et participe ainsi à la régulation de leur activité (Ceccaldi et al., 2016; Chang et al., 2017; Shiloh & Ziv, 2013). De plus, la phosphorylation de MDC1 par ATM permet le recrutement de l'ubiquitine ligase RNF8 (RING Finger 8) par MDC1. Ce recrutement initie une série d'ubiquitylations des histones H1 et H2A participant au recrutement de BRCA1 et 53BP1 (Blackford & Jackson, 2017; Ciccina & Elledge, 2010) (**Figure 10**).

En plus de la régulation des mécanismes de réparation, ATM joue un rôle essentiel dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux DSBs (**Figure 10**). Cette activité dépend notamment de la phosphorylation activatrice de la kinase CHK2 (Checkpoint Kinase 2), une cible majeur d'ATM (Shiloh & Ziv, 2013). Une fois phosphorylée, CHK2 catalyse l'inactivation des phosphatases CDC25A et CDC25C (Cell Division Cycle-25 A/C). L'inactivation de CDC25A induit l'inhibition de CDK2 et l'arrêt au cours de la phase S tandis que l'inactivation de CDC25C induit l'inhibition de CDK1 et l'arrêt du cycle à la transition G2/M (Falck et al., 2001; Matsuoka et al., 1998; Shiloh & Ziv, 2013). ATM intervient également dans l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p53. En effet, comme nous le verrons plus loin, la phosphorylation de p53 par ATM et CHK2 favorise sa stabilisation et l'induction du programme transcriptionnel aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire, à la sénescence ou la mort cellulaire par apoptose (Blackford & Jackson, 2017; Shiloh & Ziv, 2013).

2.2.3 ATR

L'activation d'ATR (Ataxia-Telangiectasia mutated and Rad3 related) dépend de la présence de régions d'ADN simple brin, lesquelles peuvent être générées comme intermédiaires de différents dommages de l'ADN. En particulier, ATR est activé en réponse au stress répliatif en raison de la formation de régions d'ADN simple brin résultantes du découplage entre l'hélicase

CMG et l'ADN polymérase. Ainsi, ATR est impliqué dans la signalisation du stress associé au divers agents inducteurs de stress répliatif dont les rayonnements ultraviolets, les inhibiteurs des topoisomérases et les inducteurs d'ICLs (Blackford & Jackson, 2017; Saldivar et al., 2017; Semlow & Walter, 2021). En dehors du stress répliatif, ATR est plus généralement activé par tous les types de dommages aboutissant à la génération de régions d'ADN simple brin, dont les DSBs (Blackford & Jackson, 2017).

L'activation de la voie de signalisation d'ATR nécessite le recouvrement de l'ADN simple brin par RPA. La formation des nucléo-filaments de RPA-ADN permet le recrutement de la protéine partenaire d'ATR, ATRIP (ATR-Interacting Protein), laquelle facilite le recrutement d'ATR (Falck et al., 2005; Zou & Elledge, 2003). ATR est ensuite activé par la protéine TOPBP1 (DNA Topoisomerase 2-Binding Protein 1) recrutée *via* le complexe 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1) formant une pince à la jonction des régions d'ADN simple brin et double brin (Ciccio & Elledge, 2010). Alternativement, ATR peut également être activé par la protéine ETAA1 (Ewing Tumor-Associated Antigen 1) interagissant directement avec RPA (Blackford & Jackson, 2017; Saldivar et al., 2017) (**Figure 11**). De manière similaire à la DNA-PKcs et ATM, ATR est phosphorylé et/ou autophosphorylé sur différents résidus dont la thréonine 1989. Néanmoins, le rôle de la phosphorylation d'ATR pour son activité demeure mal défini (Blackford & Jackson, 2017; Saldivar et al., 2017).

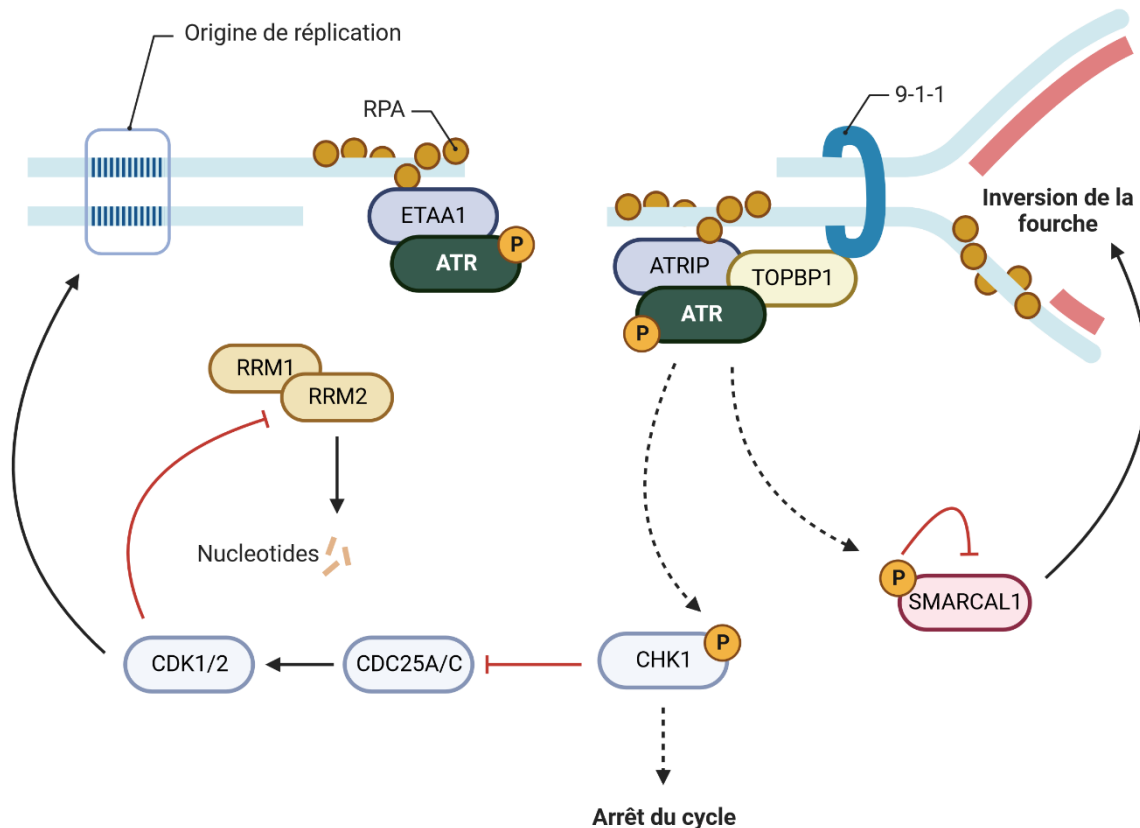


Figure 11 : La voie ATR dans la réponse aux dommages de l'ADN.

ATR est activé en présence de régions d'ADN simple brin notamment générées en réponse au stress répliatif ou comme intermédiaire de réparation des DSBs. ATRIP interagit avec les nucléofilaments de RPA-ADN et recrute ATR. Dans cette configuration, ATR est activé par la protéine TOPBP1 recrutée par le complexe 9-1-1. Alternativement, ATR est activé par la protéine ETAA1 qui interagit avec RPA. CHK1 est une cible majeure de la phosphorylation par ATR. La forme phosphorylée de CHK1 intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire, la régulation de l'activation des origines de répliation et dans la régulation du niveau de RRM2, impliqué dans la production de dNTPs. La phosphorylation inhibitrice de SMARCAL1 par ATR réprime l'inversion de la fourche de répliation et participe à sa stabilisation. Figure adaptée de (Blackford & Jackson, 2017).

Une fonction clé de la forme active d'ATR consiste en la phosphorylation et activation de CHK1 (Checkpoint Kinase 1) (**Figure 11**). Tout comme CHK2, CHK1 catalyse la phosphorylation et inactivation de CDC25A et CDC25C aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire au cours de la phase S ou G2/M (Peng et al., 1997; Sanchez et al., 1997; Sørensen et al., 2003). Une autre fonction importante d'ATR consiste en la prévention de l'effondrement de la fourche de répliation suivant l'induction d'un stress répliatif, un événement impliquant fréquemment la formation

d'un DSB. Cette fonction repose sur différents mécanismes dépendants de l'activation d'ATR (Blackford & Jackson, 2017; Saldivar et al., 2017). En effet, ATR/CHK1 répriment l'activation des origines de réplication *via* l'inhibition des CDKs et prévient ainsi l'épuisement des ressources de facteurs de réplication et de réparation tels que RPA (Toledo et al., 2013). ATR/CHK1 limitent également la formation de DSBs au niveau des fourches de réplication en régulant négativement l'action d'hélicases, telles que SMARCAL1 (SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, subfamily A-Like 1), susceptibles d'induire une inversion de la fourche de réplication et la génération de structures reconnaissables par les complexes de nucléases contenant SLX4 (Couch et al., 2013; Svendsen et al., 2009). Enfin, l'activité d'ATR permet d'augmenter la disponibilité en désoxyribonucléotides nécessaires à la réplication selon un mécanisme stimulant l'expression du gène codant la ribonucléotide réductase RRM2 (Ribonucleotide-diphosphate Reductase subunit M2), impliquée dans la production de dNTPs. En effet, CDK2 régule négativement l'expression de *RRM2*. Ainsi, l'inhibition de CDK2 par CHK1 favorise l'expression de *RRM2* (Buisson et al., 2015) **(Figure 11)**.

2.2.4 Redondances entre DNA-PKcs, ATM et ATR

De nombreuses redondances existent entre la DNA-PKcs, ATM et ATR. En effet, la DNA-PKcs est phosphorylée par ATM et ATR tandis qu'ATM est une cible de la DNA-PKcs. D'autre part, il est fréquent qu'un type de dommage à l'ADN aboutisse à la fois à des DSBs, induisant l'activation d'ATM et de la DNA-PKcs, et à des régions d'ADN simple brin, induisant l'activation d'ATR. Enfin, la DNA-PKcs, ATM et ATR catalysent l'activation de cibles communes. Par exemple, H2AX peut être phosphorylée par les trois PIKKs et pas seulement ATM. Cependant, certaines cibles demeurent majoritairement associées à une kinase en particulier. Ainsi, ATM est considérée comme la kinase principalement responsable de la phosphorylation de H2AX. De la même manière, bien que CHK1 soit phosphorylable par ATM, ATR est très largement considérée comme la kinase catalysant la phosphorylation de CHK1 (Blackford & Jackson, 2017; Jette & Lees-Miller, 2015; Saldivar et al., 2017; Shiloh & Ziv, 2013).

2.3 p53 dans la signalisation de la DDR

La protéine p53 agit principalement comme un facteur de transcription et constitue un élément central de régulation de l'homéostasie cellulaire en réponse à divers stress, dont les dommages de l'ADN. En effet, la protéine p53 régule la transcription de nombreux gènes notamment impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, la réparation des dommages, l'adaptation métabolique et le déclenchement de la mort cellulaire par apoptose. En conséquence, p53 joue un rôle fondamental dans la détermination de la survie ou de la mort cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN (Thomas et al., 2022; Vousden & Prives, 2009).

2.3.1 La régulation de p53 dans la DDR : les modifications post-traductionnelles

L'activité transcriptionnelle de p53 est majoritairement régulée par ses modifications post-traductionnelles, ses interactions avec différents cofacteurs et l'état de condensation de la chromatine (Hafner et al., 2019; Vousden & Prives, 2009). Dans cette partie, nous nous intéresserons plus spécifiquement aux modifications post-traductionnelles de p53 et en particulier celles dépendantes des PIKKs de la DDR.

La protéine p53 contient six domaines majeurs : le domaine d'activation N-terminal (Tandem Activation Domain, TAD), le domaine riche en proline (Proline-Rich Domain, PRD), le domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain, DBD), le domaine de tetramérisation (Tetramerization Domain, TD) et le domaine C-terminal (C-Terminal Domain, CTD). Les modifications post-traductionnelles majeures de p53 incluent notamment des ubiquitinations, phosphorylations et acétylations réparties sur différentes régions de la protéine (Hafner et al., 2019; Y. Liu et al., 2019) (**Figure 12**).

La protéine MDM2 (Murine Double Minute 2) constitue l'E3 ubiquitine ligase majeure catalysant l'ubiquitinylation de p53 et cible six résidus lysines localisés dans le domaine CTD (K370, K372, K373, K381, K382 et K386). MDM2 est un acteur essentiel de la régulation de la stabilité de p53. En effet, en absence de stress cellulaire, l'ubiquitinylation de p53 par MDM2 induit sa dégradation dépendante du protéasome. De manière intéressante, le gène *MDM2* est également une cible transcriptionnelle de p53. En conséquence, l'activation de p53 favorise un système de rétrocontrôle négatif favorisant sa dégradation dépendante de MDM2 et du protéasome et participe à l'inhibition de cette activation. A l'inverse, les modifications post-

traductionnelles additionnelles de p53, notamment les phosphorylations et acétylations, jouent un rôle important dans l'inhibition de l'interaction entre MDM2 et p53. En effet, ces modifications favorisent la stabilisation, la translocation nucléaire et l'homotétramérisation de p53 permettant sa fixation sur des séquences cibles spécifiques de l'ADN et l'activation de son activité transcriptionnelle (Aubrey et al., 2018; Hafner et al., 2019; Y. Liu et al., 2019).

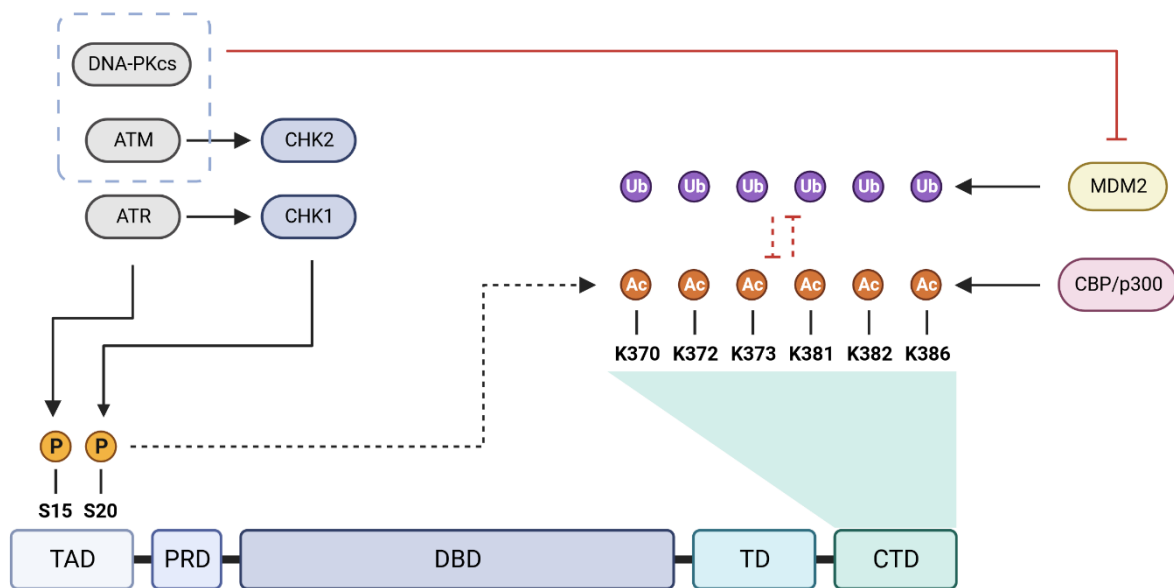


Figure 12 : Modifications post-traductionnelles de p53 associées à l'activité des PIKKs de la DDR.

La protéine p53 contient six domaines majeurs : le domaine d'activation N-terminal (Tandem Activation Domain, TAD), le domaine riche en proline (PRD), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine de tétramérisation (TD) et le domaine C-terminal (CTD). La sérine 15 est le site majeur de phosphorylation par la DNA-PKcs, ATM et ATR. La sérine 20 est le site majeur de phosphorylation par CHK1 et CHK2. La DNA-PKcs et ATM catalysent la phosphorylation inhibitrice de MDM2. La phosphorylation des sérines S15 et S20 de p53 favorise l'acétylation des lysines du domaine CTD. Les acétylations des lysines du domaine CTD inhibent leur ubiquitinylation et inversement. Figure inspirée de (Hafner et al., 2019; Y. Liu et al., 2019).

Les sites de phosphorylation sont répartis tout le long de la protéine p53 mais sont enrichis dans le domaine TAD. La majorité de ces phosphorylations sont induites en réponse aux stress cellulaires et initie l'activation de p53 (Y. Liu et al., 2019). En particulier, ATM, ATR et la DNA-PKcs catalysent la phosphorylation de la sérine S15 tandis que CHK1 et CHK2 catalysent la phosphorylation de la sérine S20. Ces phosphorylations induisent une déstabilisation de

l'interaction entre p53 et MDM2, favorisant ainsi la stabilisation de p53 (Blackford & Jackson, 2017; Jette & Lees-Miller, 2015; Y. Liu et al., 2019). ATM et la DNA-PKcs accentuent également la stabilisation de p53 en catalysant la phosphorylation inhibitrice de MDM2 (Blackford & Jackson, 2017; Wade et al., 2013). Les phosphorylations de p53 sur différents sites du domaine TAD, dont S15 et S20, favorisent également son acétylation dépendante des co-activateurs CBP (CREB-binding protein) et p300, une modification post-traductionnelle participant à l'activation de p53. En particulier, ces co-activateurs catalysent l'acétylation de p53 sur les six lysines K370, K372, K373, K381, K382 et K386 également ciblées par MDM2. Ces acétylations constituent ainsi des modifications post-traductionnelles antagonistes à l'ubiquitinylation dépendante de MDM2 et favorisent la stabilisation de p53 (Y. Liu et al., 2019) **(Figure 12)**.

2.3.2 Activités majeures de p53 dans la DDR

i. Les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN

p53 participe à la régulation de plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN incluant les mécanismes NER, BER, MMR, c-NHEJ, alt-EJ et HR. Brièvement, p53 participe à la régulation des mécanismes NER, BER et MMR à la fois *via* ses activités transcriptionnelles et ses interactions avec certaines protéines impliquées dans ces voies de réparation (Sengupta & Harris, 2005; Williams & Schumacher, 2016). Les mécanismes NER, BER et MMR n'étant pas étudiés dans le cadre de cette thèse, les régulations de p53 associées à ces mécanismes ne seront pas davantage détaillées dans cette introduction.

Plusieurs études montrent que p53 favorise la ligation précise des extrémités, dépendante du c-NHEJ, par rapport à la ligation dépendante du alt-EJ, constituant une source d'erreurs plus importante. En effet, l'inhibition pharmacologique de p53 par la pifithrin- α dans des cellules de souris n'impacte pas la fréquence globale de ligation des DSBs mais induit une réduction de la fréquence de la ligation précise des extrémités (Y. Lin et al., 2003). Cet effet est également retrouvé dans des lignées humaines déplétées pour *TP53* (W. Y. Lin et al., 2013; Shin et al., 2007). Les mécanismes à l'origine de la régulation dépendante de p53 demeurent mal définis, néanmoins, son activité transcriptionnelle ainsi que sa capacité à se lier à l'ADN sont suggérés comme participant à cette régulation (Shin et al., 2007; W. Tang et al., 1999). Outre son rôle dans la promotion du c-NHEJ, p53 induit l'élimination des cellules compromises pour ce

mécanisme. En effet, les souris *Xrcc4*^{-/-} ou *Lig4*^{-/-}, déficientes pour le c-NHEJ, présentent une mortalité embryonnaire associée à une forte induction de l'apoptose et ce phénotype est compensé par la délétion additionnelle de *p53* (Frank et al., 2000; Gao et al., 2000). Dans ce dernier cas, les souris *Xrcc4*^{-/-} *p53*^{-/-} ou *Lig4*^{-/-} *p53*^{-/-} succombent néanmoins à des lymphomes des cellules B progénitrices. Ainsi, l'élimination des cellules déficientes pour le c-NHEJ participe au rôle oncosuppressif de *p53*.

Les activités de *p53* associées à la régulation de la réparation par HR sont mieux définies que pour les mécanismes c-NHEJ et alt-EJ et incluent des régulations dépendantes et indépendantes de son rôle de facteur de transcription. De manière surprenante, *p53* se lie au promoteur de *RAD51* et diminue son niveau d'expression dans les lignées cellulaires humaines (Arias-Lopez et al., 2006; Fong et al., 2011). De plus, *p53* inhibe la réparation par HR selon un mécanisme dépendant de son interaction avec les protéines humaines *RAD51* et *RAD54* (Linke et al., 2003). Dans cette dernière étude, les auteurs suggèrent en particulier que l'inhibition de *RAD51* (et *RAD54*) par *p53* constitue un mécanisme de répression des recombinaisons inappropriées de l'ADN, participant à la préservation de l'intégrité génomique. D'autre part, la répression de la HR par *p53* semble requise pour induire l'apoptose dans des cellules ayant subi un excès de dommages à l'ADN (Ivanov et al., 2003). Cette conclusion renforce l'idée du rôle protecteur de l'inhibition de *RAD51* par *p53*, une action à première vue contradictoire avec la protection du génome, mais néanmoins nécessaire à cet objectif. D'autres mécanismes dépendants de *p53* indiquent une modulation de la HR plus complexe qu'une simple répression et adaptable en fonction du contexte. En particulier, le mécanisme de réparation par HR est régulé par l'interaction de *p53* avec RPA selon un mécanisme dépendant de la phosphorylation de ces deux protéines. En effet, la phosphorylation de *p53* par ATR permet son interaction avec RPA et induit la répression de la réparation par HR en réponse à un stress répliatif (Sirbu et al., 2011). Ce mécanisme inhibe ainsi les événements de recombinaison au cours de la réplication de l'ADN. A l'inverse, la phosphorylation de *p53* par ATR et ATM et de RPA par la DNA-PKcs en réponse aux DSBs inhibe l'interaction entre *p53* et RPA, permettant l'activation de la réparation par HR (Serrano et al., 2013). Ainsi, la modulation de la HR par *p53* apparaît comme un mécanisme adaptable, permettant de prévenir un excès de recombinaisons

non nécessaires, potentiellement favorables à l'instabilité génomique, sans compromettre la réparation des lésions de type DSBs.

ii. L'arrêt du cycle cellulaire

L'arrêt du cycle cellulaire constitue un mécanisme essentiel de la DDR permettant d'éviter la propagation de dommages en laissant du temps pour l'exécution des mécanismes de réparation. L'arrêt du cycle cellulaire est en partie régulé par les PIKKs de la DDR, en particulier ATM/CHK2 et ATR/CHK1 (Blackford & Jackson, 2017; Saldivar et al., 2017; Shiloh & Ziv, 2013). La régulation de la transcription dépendante de p53 est également un système de régulation fondamental de l'arrêt du cycle cellulaire (Thomas et al., 2022; Vousden & Prives, 2009). En particulier, p53 contrôle indirectement la répression de la transcription de nombreux gènes nécessaires à la progression du cycle *via* la voie dépendante de p53, de CDKN1A (p21) (Cyclin-Dependent Kinases inhibitor 1A) et du complexe de répression de la transcription DREAM (Dimerization partner RB-like, E2F, MuvB) (Engeland, 2018) (**Figure 13**). Le complexe DREAM est constitué du complexe central MuvB (Multivulval class B), des facteurs de transcriptions E2F4/E2F5 et des protéines p107 et p130 et sa formation dépend de l'augmentation de l'expression de *p21* médiée par p53. Brièvement, l'activation de p53 induit l'augmentation du niveau de transcription de *p21*, lequel inhibe les complexes des cyclines/CDKs responsables de la phosphorylation des protéines p107 et p130. Ainsi, l'augmentation d'expression de *p21* induit l'hypophosphorylation de p107 et p130, un mécanisme permettant l'association de ces protéines avec le complexe central MuvB pour former le complexe DREAM. Celui-ci réprime ainsi la transcription de nombreux gènes, notamment des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaires tels que *CCNB1* et *CCNB2* (cyclines B1 et B2), *CDC25A* (phosphatase) ou *CDK1* et *CDK2* (Engeland, 2018; Hafner et al., 2019) (**Figure 13**).

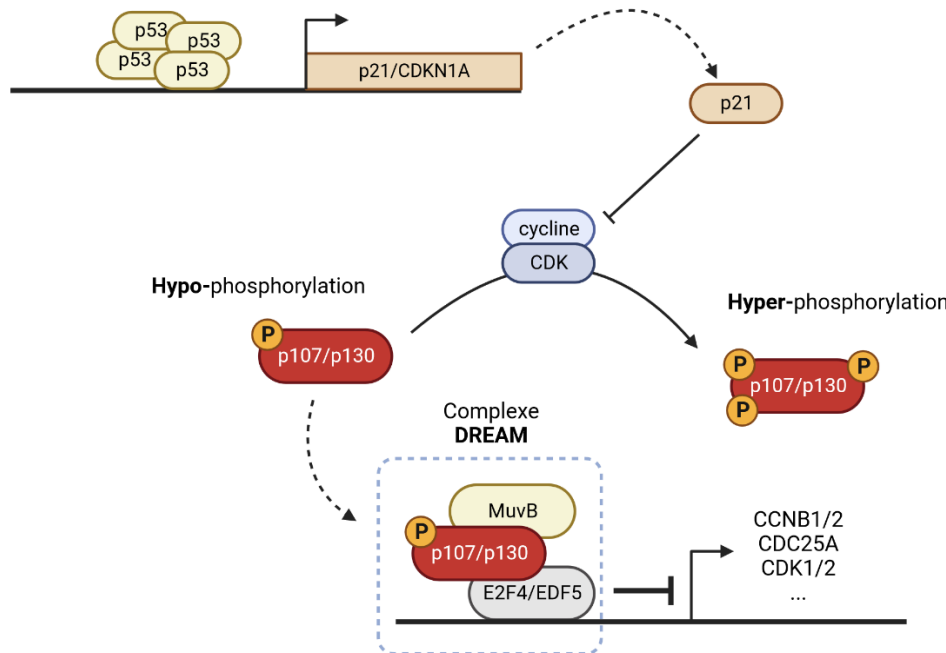


Figure 13 : La voie p53-p21-DREAM de régulation du cycle cellulaire.

La forme active de p53 augmente le niveau de transcription de p21. p21 inhibe les complexes cyclines/CDKs et favorise l'hypophosphorylation de p107 et p130. Les protéines p107 et p130 hypophosphorylées s'associent avec le complexe central MuvB pour former le complexe DREAM. Celui-ci agit comme un répresseur de la transcription de nombreux gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Figure adaptée de (Engeland, 2018).

iii. L'apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée caractérisée au niveau morphologique par une condensation du cytoplasme et du noyau et la formation de corps apoptotiques (Kerr et al., 1972). Il existe deux voies de signalisation principales de l'apoptose : la voie extrinsèque (ou voie des récepteurs à domaine de morts) et la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale). La voie extrinsèque est induite par la liaison de ligands extracellulaires aux récepteurs à domaines de mort de la famille des TNF-R (Tumor Necrosis Factor Receptor) incluant les récepteurs TRAIL (TRAIL-R), Fas/CD95 et TNFR1 (**Figure 14**). La voie intrinsèque est induite par différents stimuli, suite à des stress cellulaires dont les dommages de l'ADN, qui vont générer des modifications mitochondriales comme la chute du potentiel de la membrane interne mitochondriale et la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Green & Llambi, 2015).

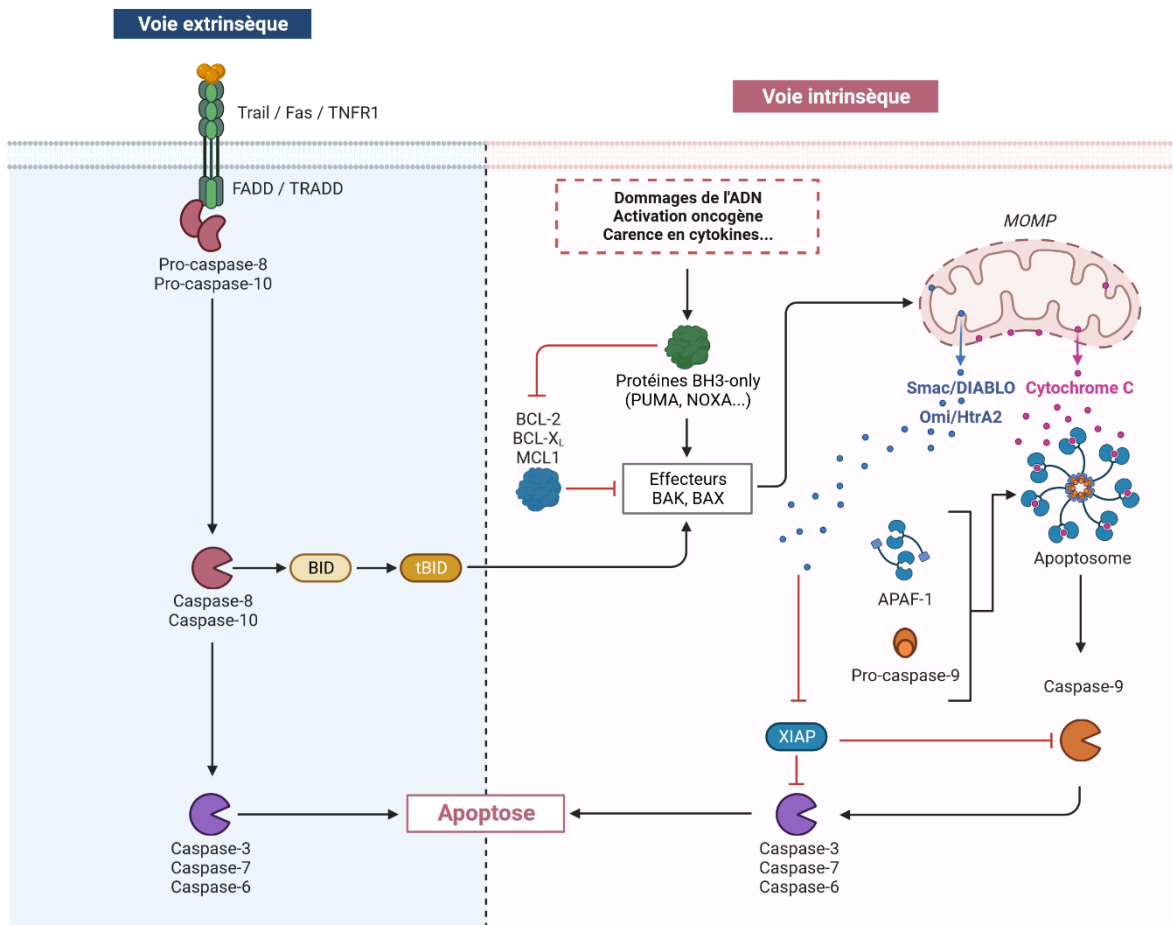


Figure 14 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

La voie extrinsèque est induite par la liaison de ligands extracellulaires aux récepteurs à domaines de mort de la famille des TNF-R induisant le recrutement des protéines adaptatrices FADD ou TRADD. Celles-ci permettent l'activation de la caspase-8 ou caspase-10. La voie extrinsèque peut également induire la voie intrinsèque de l'apoptose via le clivage de la protéine « BH3-only » BID par la caspase-8. La voie intrinsèque est induite par divers stress cellulaires qui régulent positivement les protéines « BH3-only » pro-apoptotiques. Celles-ci inhibent les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 et activent les protéines effectrices comme BAX et BAK. Ces dernières induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) aboutissant à la libération du cytochrome c, de Smac/DIABLO et Omi/HtrA2. Le cytochrome c s'associe avec APAF-1 et la procaspase-9 pour former l'apoptosome qui permet l'activation de la caspase-9. Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 participent à l'activation de la caspase-9 en la libérant de son interaction avec l'inhibiteur de caspase XIAP. Les voies extrinsèques et intrinsèques aboutissent à l'activation des caspases effectrices de l'apoptose (caspases -3, -7, -6). Figure inspirée de (Czabotar et al., 2014; Green & Llambi, 2015).

Les voies intrinsèque et extrinsèque conduisent à l'activation des caspases (cysteine-aspartic proteases), une classe de protéases catalysant le clivage de chaînes peptidiques suite à des

résidus d'acides aspartiques. Les caspases impliquées dans l'apoptose sont classées en deux groupes : les caspases initiateuses (caspases-2, -8, -9 et -10) et les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7). Les caspases initiateuses contiennent de longs prodomaines avec des séquences d'interactions protéiques de type DED (DEAD Effector Domain) ou CARD (Caspase Recruitment Domain) et peuvent s'autoactiver (par transclivage) suite à leurs rapprochements *via* des protéines adaptatrices (FADD, TRADD, APAF-1) dans de larges complexes (Apoptosome, DISC). A la suite de leur activation, les caspases initiateuses clivent et activent les caspases effectrices, lesquelles induisent à leur tour le clivage de nombreux substrats impliqués dans les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à l'apoptose (Green & Llambi, 2015; Shalini et al., 2015).

La voie intrinsèque de l'apoptose est contrôlée par les membres de la famille BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2 protein) divisée en trois catégories : les protéines anti-apoptotiques comme BCL-2, BCL-X_L ou MCL-1, les protéines « BH3-only » pro-apoptotiques comme PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis), BID (BH3 Interacting-Domain death agonist) ou NOXA (PMAIP1) (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1) et les protéines effectrices de l'apoptose comme BAX (BCL-2-associated X protein) et BAK (BCL-2 antagonist or Killer). En absence de stress, les protéines anti-apoptotiques de cette famille inhibent l'action de BAX et BAK. En présence de stress, les protéines pro-apoptotiques de type « BH3-only » sont activées par divers mécanismes (régulation transcriptionnelle, phosphorylation, clivage) et activent les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK directement et/ou indirectement *via* l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de type BCL-2. Les protéines BAX et BAK induisent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP) ce qui induit la libération du cytochrome c, lequel s'associe avec APAF-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor 1) et la procaspase-9 pour former l'apoptosome. Ce complexe induit ainsi le rapprochement des procaspases-9, aboutissant à leur activation. La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale induit également le relargage de Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with LOw PI) et Omi/HtrA2 (High-Temperature Requirement A2) qui participent à l'activation de la caspase-9 en la libérant de son interaction avec l'inhibiteur de caspase XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis) (Czabotar et al., 2014; Green & Llambi, 2015) (**Figure 14**).

La voie extrinsèque de l'apoptose dépend de la liaison de ligands (FAS ligand, TNF α) aux récepteurs à domaine de mort de la famille TNF-R (TNF-R1, FAS, DR4, DR5). Dans ce contexte, l'apoptose est induite par l'activation de la caspase-8 (ou caspase-10) médiée par le recrutement des protéines adaptatrices FADD (Fas-Associated Death Domain factor) ou TRADD (TNF-R-Associated Death Domain protein) au niveau des récepteurs à domaine de mort. La voie extrinsèque peut également induire la voie intrinsèque de l'apoptose *via* le clivage de la protéine proapoptotique « BH3-only » BID en sa forme active tBID par la caspase-8 (Czabotar et al., 2014; Green & Llambi, 2015; Shalini et al., 2015) **(Figure 14)**.

L'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose en réponse à un stress cellulaire peut être régulée par p53. En effet, p53 régule la transcription de différents gènes impliqués dans cette voie. En particulier, p53 peut activer la transcription des gènes pro-apoptotiques *PUMA*, *NOXA* et *BAX* et, à l'inverse, inhiber la transcription des gènes anti-apoptotiques *BCL-2* et *MCL-1*. Le gène codant la protéine APAF-1, nécessaire à la formation de l'apoptosome, est également une cible transcriptionnelle de p53. En plus de ses gènes cibles associés à la voie intrinsèque, p53 peut réguler la transcription de gènes associés à la voie extrinsèque tel que le gène codant le récepteur à domaine de mort Fas. Ainsi, bien que la voie intrinsèque de l'apoptose apparaisse comme la principale voie de mort cellulaire induite et/ou régulée par p53 en réponse aux dommages de l'ADN, les deux voies principales de l'apoptose (intrinsèque et extrinsèque) peuvent être induites et/ou régulées par son activité transcriptionnelle (Aubrey et al., 2018; Czabotar et al., 2014).

3 - Les voies de la DDR dans les RCC

3.1 Liens entre la DDR et les gènes associés aux RCC

Les gènes *BAP1*, *SETD2* et *PBRM1*, fréquemment mutés dans les ccRCC et pRCC, codent des protéines de remodelage de la chromatine notamment impliquées dans la réparation des DSBs par le mécanisme HR (Walton et al., 2023). En réponse aux dommages de l'ADN, BAP1 est phosphorylé par ATM ou ATR et est localisé au niveau des DSBs. Dans ce contexte, BAP1 agit comme un régulateur de la réparation des DSBs en participant au remodelage de la chromatine favorable au recrutement des protéines de réparation comme BRCA1 et RAD51 (Nishikawa et al., 2009; Walton et al., 2023; Yu et al., 2014). De manière similaire, la triméthylation des histones

H3 sur le résidu lysine 36, médiée par SETD2, participe au recrutement de la protéine CtIP nécessaire à la réparation des DSBs par HR (Kanu et al., 2015; Pfister et al., 2014; Sartori et al., 2007). Enfin, le remodelage de la chromatine dépendant de PBRM1 facilite la réparation en inhibant la transcription à proximité des DSBs (Kakarougkas et al., 2014). D'autre part, une étude récente montre que l'inactivation de *PBRM1* dans des lignées cellulaires de RCC induit une augmentation du niveau de dommages de l'ADN associés au stress réplcatif. Ce défaut est corrélé à une augmentation de la sensibilité cellulaire aux inhibiteurs de PARP et d'ATR, suggérant que ces inhibiteurs pourraient constituer une nouvelle option thérapeutique pour les patients présentant des tumeurs de RCC avec une altération de *PBRM1* (Chabanon et al., 2021).

L'hypoxie au sens « classique », induite par une diminution du niveau d'oxygène environnemental, est un stress cellulaire persistant au sein des tumeurs qui favorise l'instabilité génomique, notamment par la dérégulation des mécanismes de réparation des dommages de l'ADN (M. Tang et al., 2021). Comme détaillé précédemment, l'altération de la voie de réponse à l'hypoxie dépendante de HIF est une caractéristique des RCC pouvant résulter des altérations génétiques de *VHL*, de gènes codant des protéines de la voie PI3K-AKT-mTOR, tels que *MET* et *PTEN*, ou de gènes codant des protéines du cycle de Krebs, tels que *FH* et *SDHB* (Linehan et al., 2019) (**Figure 3**). Dans ce contexte, la stabilisation et l'activation du facteur de transcription HIF α peut participer à l'altération des mécanismes de réparation régulés dans la réponse à l'hypoxie (Rohwer et al., 2013). En particulier, HIF1 α et HIF2 α régulent l'expression de *BRCA1* dépendante du facteur de transcription c-Myc. En effet, HIF1 α peut indirectement inhiber l'expression de *BRCA1* via le déplacement de la liaison de c-Myc au niveau du promoteur de *BRCA1* (Koshiji et al., 2004). A l'inverse, l'interaction avec BRCA1 augmente la stabilisation et l'activité de HIF1 α dans les cellules de cancer du sein (Kang et al., 2006). D'autre part, les tumeurs du sein avec une mutation de *BRCA1* ou *BRCA2* présentent une augmentation du niveau protéique de HIF1 α à un stade précoce dans le développement tumoral (van der Groep et al., 2013). A l'opposé de la régulation par HIF1 α , la stabilisation de HIF2 α induit une augmentation de l'expression des gènes cibles de c-Myc, dont *BRCA1*, dans les tumeurs ccRCC exprimant uniquement HIF2 α . Dans cette étude, les auteurs proposent que l'expression de

HIF2 α permet d'améliorer la gestion du stress réplicatif dans les cellules tumorales proliférant rapidement (Gordan et al., 2008).

D'autre part, la perte de pVHL dans les lignées dérivées de RCC induit une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, notamment dans la réparation par HR comme *BRCA1* et *RAD51*, associée à une augmentation de la sensibilité cellulaire aux inhibiteurs de PARP (Scanlon et al., 2017). Dans cette étude, les auteurs montrent que les changements de niveau d'expression des gènes impliqués dans la réparation par HR sont indépendants du niveau d'expression de HIF1 α . Cependant, le rôle des autres facteurs HIF α demeurent indéterminé. L'altération de *VHL* est également corrélée à une diminution du niveau d'expression des gènes impliqués dans le mécanisme HR dans les cellules issues de patients atteints de RCC (Scanlon et al., 2017). D'autre part, pVHL favorise la réparation par HR selon un mécanisme indépendant de son rôle dans la régulation des facteurs de transcription HIF α mais dépendant de l'ubiquitinylation de pVHL sur le résidu lysine 63 médiée par l'E3 ubiquitine ligase SOCS1 (Suppressor Of Cytokine Signaling 1) (Metcalf et al., 2014).

Enfin, les formes de RCC héréditaires présentant un défaut du gène *FH* (HLRCC) ou des gènes *SDH* sont associés à un défaut de réparation des DSBs. En effet, l'accumulation de fumarate ou de succinate conduit à une réduction de la réparation par HR selon un mécanisme dépendant de l'inhibition des lysines démethylases KDM4A et KDM4B impliquées dans la régulation de la réparation des dommages de l'ADN (Sulkowski et al., 2018).

3.2 Altérations des gènes de la DDR dans les RCC

Hormis les altérations des gènes connus pour être associés au développement de RCC, des études de séquençage haut-débit mettent en avant l'existence de variants pathogéniques (VPs) dans de nombreux gènes des voies de signalisation et de réparation des dommages de l'ADN. En particulier, une étude incluant 844 patients atteints d'un RCC de manière précoce (<60 ans) révèle l'existence de VPs constitutionnels dans des gènes de la DDR chez 8,55% de ces patients. En comparaison, seulement 3,7% des patients de cette cohorte sont porteurs de VPs constitutionnels dans les gènes classiquement associés au développement de RCC (Hartman et al., 2020). Cette tendance est également retrouvée dans une étude similaire plus récente, démontrant l'existence de VPs constitutionnels dans des gènes de la DDR chez 10/22 patients

atteints d'un RCC avant 60 ans, contre 4/22 pour les gènes associés aux RCC héréditaires (Demidova et al., 2023). D'autres études mettent en évidence une association entre la présence de VPs constitutionnels ou somatiques dans les gènes de la DDR et le degré d'évolution des ccRCC. Ainsi, ce type de variants est identifiés chez 25% (variants somatiques) et 19% (variants somatiques ou constitutionnels) des patients présentant un ccRCC à un stade localement avancé et un ccRCC métastatique, respectivement (Ged et al., 2020; Na et al., 2019).

III Rôles de *DCLRE1B* dans le maintien du génome

1 - La famille des protéines SNM1

La famille des nucléases SNM1 fut à l'origine identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de travaux portant sur l'étude de la sensibilité de mutants à différents types de sources de dommages de l'ADN. Ces études menèrent à l'identification du gène *PSO2/SNM1* (sensitive to Psoralen 2/Sensitive to Nitrogen Mustard 1) spécifiquement associé à une sensibilité aux ICLs (Cassier-Chauvat & Moustacchi, 1988; Henriques & Moustacchi, 1980; Ruhland et al., 1981). Chez les vertébrés, *PSO2/SNM1* comporte trois homologues codant les protéines de la famille SNM1 : *DCLRE1A* (DNA Cross-Link Repair 1A) codant SNM1A, *DCLRE1B* (DNA Cross-Link Repair 1B) codant SNM1B/Apollo et *DCLRE1C* (DNA Cross-Link Repair 1C) codant SNM1C/Artemis. L'ensemble des protéines SNM1 sont des nucléases membres de la superfamille des enzymes contenant un domaine MBL (Metallo- β -Lactamase) et sous-classées dans la famille caractérisée par l'inclusion d'un domaine β -CASP (CPSF, Artemis, SNM1, PSO2) au sein du domaine MBL (**Figure 15**). Au niveau fonctionnel, les trois nucléases SNM1 sont impliquées dans divers processus cellulaires associés à la réparation de l'ADN et au maintien de l'intégrité génomique (Cattell et al., 2010; Yan et al., 2010).

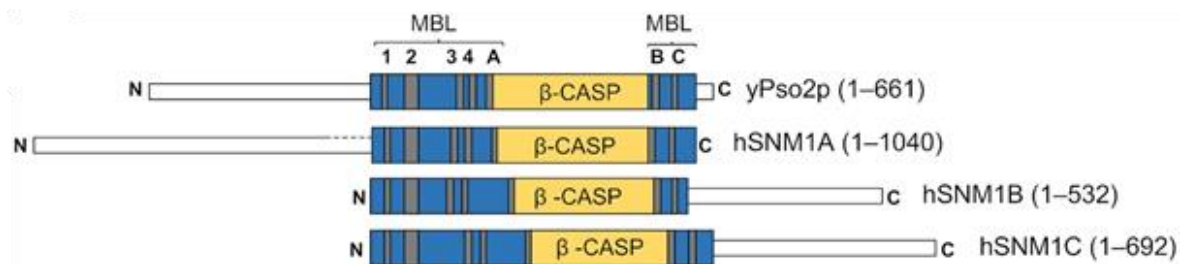


Figure 15 : Structures de la protéine Pso2 (*Saccharomyces cerevisiae*) et de ses homologues SNM1A, SNM1B et SNM1C chez l'humain.

Alignement des protéines Pso2 de *Saccharomyces cerevisiae* et des protéines SNM1A, SNM1B et SNM1C humaines. Les domaines MBL et β -CASP caractéristiques de cette famille de protéines sont indiqués en bleu et jaune, respectivement. Les motifs caractéristiques du domaine MBL sont numérotés de 1 à 4. Les motifs caractéristiques des protéines membres de la famille MBL contenant un domaine β -CASP sont indiqués par les lettres A à C. Le nombre d'acide aminés de chaque protéine est indiqué entre parenthèses. Figure issue de (Baddock et al., 2021).

1.1 SNM1A

Le gène *DCLRE1A* humain est localisé sur le chromosome 10 et code la protéine SNM1A (Sensitive to Nitrogen Mustard 1A). Les études *in vitro* réalisées sur la version entière de SNM1A démontrent que cette protéine possède essentiellement une activité exonucléase 5' vers 3' efficace sur l'ADN simple brin et double brin (Hazrati et al., 2008; Sengerová et al., 2012). SNM1A est impliquée dans divers processus de réparation des dommages de l'ADN, néanmoins, la majorité des études mettent en avant son rôle dans la réparation des ICLs (Baddock et al., 2020). La délétion de *Dclre1a* induit ainsi une augmentation de la sensibilité des souris *Dclre1a*^{-/-} à la MMC. Cette sensibilité est également retrouvée dans les MEFs, les cellules souches embryonnaires et les fibroblastes de peau issus de ces souris *Snm1a*^{-/-} (Akhter et al., 2005; Dronkert et al., 2000; Hemphill et al., 2008). De la même manière, la délétion de *DCLRE1A* dans la lignée cellulaire DT40 de poulet et sa déplétion dans la lignée cellulaire HeLa humaine induisent une augmentation de la sensibilité des cellules aux ICLs (Ishiai et al., 2004; A. T. Wang et al., 2011). Au niveau moléculaire, SNM1A est retrouvée parmi les protéines qui s'accumulent au niveau des ICLs induits par le psoralène dans des extraits d'œufs de *Xenopus* (Räschle et al., 2015). Par ailleurs, la protéine SNM1A humaine interagit avec PCNA et cette interaction est renforcée sous l'effet de l'ubiquitinylation de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) par l'E3 ubiquitine ligase RAD18 en réponse à la MMC ou aux UVs (K. Yang et al., 2010). Dans cette étude, les auteurs suggèrent donc un modèle dans lequel l'ubiquitinylation de PCNA dépendante de RAD18 participe au recrutement de SNM1A au niveau des fourches de réplifications soumise à un stress répliatif associé ou non à une ICL (K. Yang et al., 2010). Bien que les mécanismes d'action ne soient pas complètement définis, SNM1A semble intervenir dans l'étape d'excision des ICLs. En effet, l'étude de l'activité *in vitro* de la protéine SNM1A humaine démontre sa capacité à digérer un substrat d'ADN contenant une ICL au-delà de la lésion (Abdullah et al., 2017; Sengerová et al., 2012; A. T. Wang et al., 2011). De plus, SNM1A présente une relation épistatique avec XPF-ERCC1 (c'est-à-dire que la délétion du gène codant XPF-ERCC1 aboutit au même phénotype que la co-délétion des gènes codant XPF-ERCC1 et SNM1A), une protéine essentielle à l'excision des ICLs, dans les cellules HeLa en réponse à la MMC (A. T. Wang et al., 2011). Finalement, la protéine SNM1A humaine est capable

de digérer un substrat d'ADN au-delà d'une ICL à partir d'une incision en 5' réalisée par XPF-ERCC1 *in vitro* (Abdullah et al., 2017; A. T. Wang et al., 2011).

Hormis la réparation des ICLs, SNM1A pourrait être impliquée dans la DDR en réponse aux DSBs puisque la protéine SNM1A humaine co-localise sous forme de foci avec des facteurs de la signalisation de ces dommages comme 53BP1 et MRE11 en réponse aux IR (Richie et al., 2002). Ce recrutement au niveau des foci de signalisation des DSBs est médié par la kinase ATM, laquelle interagit avec SNM1A, et la déplétion *DCLRE1A* induit un défaut d'induction du point de contrôle en G1 en réponse aux IR dans des MEFs et dans la lignée HT1080 humaine (Akhter & Legerski, 2008). En revanche, les souris *Dclre1a*^{-/-} ne présentent pas d'augmentation de sensibilité aux IR (Akhter et al., 2005; Dronkert et al., 2000).

Deux études démontrent également que la protéine *Snm1a* murine joue un rôle dans la réponse au stress mitotique. Les souris *Dclre1a*^{-/-} présentent ainsi une augmentation de la sensibilité au taxol, un inhibiteur de polymérisation des microtubules, associée à un défaut d'activation du point de contrôle au stade prométaphase de la mitose dans les MEFs correspondants (Akhter et al., 2004, 2005). D'autre part, les ARNm du gène *DCLRE1A* humain contiennent une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) dans leur région 5' non traduite induisant une augmentation de la traduction de ces ARNm spécifiquement au cours de la mitose, ce qui suggère également un rôle de SNM1A associé à cette phase du cycle cellulaire (X. Zhang et al., 2002).

Certaines études interrogent sur une possible implication de *DCLRE1A* dans différents types de cancers. Deux SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) de *DCLRE1A* sont ainsi associés à une augmentation du risque de cancers respectivement dans des populations atteintes de cancer du poumon et de cancer du sein (Kohno et al., 2006; Shahi et al., 2019). De plus, une augmentation du niveau d'expression de *DCLRE1A* au niveau transcriptionnel est associée à une diminution de la survie chez des patients atteints de cancer colorectal ou de l'ovaire (Laporte et al., 2020; X. Wang et al., 2016). Finalement, une étude rapporte une augmentation de la fréquence d'apparition de tumeurs, en particulier des lymphomes et adénomes, chez les souris *Snm1a*^{-/-}, suggérant un possible rôle oncosuppresseur de *Snm1a* (Akhter et al., 2005).

1.2 SNM1C/Artemis

Le gène *DCLRE1C* humain est localisé sur le chromosome 10 et code la protéine SNM1C (Sensitive to Nitrogen Mustard 1C), aussi connue sous le nom d'Artemis. *DCLRE1C* est le plus étudié des gènes codant les membres de la famille SNM1 chez les mammifères et fut originellement caractérisé comme responsable d'une forme sévère d'immunodéficience combinée (Severe Combined Immunodeficiency, SCID), caractérisée par une perte presque complète de lymphocytes B et T et une hypersensibilité aux IR (Moshous et al., 2001; Rooney et al., 2002). En accord avec ces phénotypes humain et murin, Artemis est connue pour jouer un rôle dans le mécanisme du c-NHEJ intervenant au cours de la réparation des DSBs et de la recombinaison V(D)J du processus de maturation des anticorps et des récepteurs des lymphocytes T (Cattell et al., 2010; Yan et al., 2010).

Les études réalisées *in vitro* démontrent que la protéine Artemis humaine seule possède une activité exonucléase 5' vers 3' efficace sur les substrats d'ADN simple brin mais dont la fonction biologique demeure indéterminée (Ma et al., 2002, 2005). En revanche, Artemis forme un complexe avec la DNA-PKcs *in vitro* et *in vivo* et cette interaction conduit à l'acquisition par Artemis d'une activité endonucléase essentielle à ses fonctions (Goodarzi et al., 2006; Ma et al., 2002; Niewolik et al., 2006). En effet, cette activité endonucléase catalyse le clivage d'une grande diversité de structures d'ADN contenant une transition entre de l'ADN double brin et simple brin incluant les protubérances en 3' et 5', les structures en forme de boucle et celles contenant un SSB (Ma et al., 2002, 2005). Comme décrit précédemment, l'activité endonucléase d'Artemis participe ainsi à la réparation d'une partie des DSBs en catalysant l'élimination des protubérances d'ADN simple brin en 5' et 3' de façon à permettre la ligation d'extrémités initialement non compatibles (Darroudi et al., 2007; Pannunzio et al., 2018; Riballo et al., 2004). De plus, l'activité endonucléase d'Artemis catalyse l'ouverture des structures d'ADN en épingle à cheveux formées suite à l'élimination de régions d'ADN V, D ou J au cours de la recombinaison V(D)J (Ma et al., 2002; Niewolik et al., 2006).

Indépendamment de son rôle dans la réparation par le c-NHEJ, certaines études de l'équipe de Randy J. Legerski suggèrent également un rôle d'Artemis dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire activés en réponse aux dommages de l'ADN. En effet, la terminaison

du point de contrôle entre les phases G2 et M et du point de contrôle de la phase S nécessitent la phosphorylation d'Artemis respectivement par les kinases ATM et ATR dans les cellules humaines HEK293T (Geng et al., 2007; H. Wang et al., 2009).

1.3 SNM1B/Apollo

Le gène *DCLRE1B/Apollo* humain est localisé sur le chromosome 1 et code la protéine SNM1B (Sensitive to Nitrogen Mustard 1B), aussi connue sous le nom d'Apollo (Demuth et al., 2004). Il est à noter que le gène et la protéine seront appelés Apollo dans la suite de mon mémoire afin de simplifier la compréhension du texte et des figures. Tout comme SNM1A, la protéine Apollo est une exonucléase 5' vers 3' (Lenain et al., 2006; Sengerová et al., 2012). Jusqu'à présent, seule l'équipe d'Éric Gilson a réussi à produire la version entière de la protéine Apollo recombinante (Lenain et al., 2006). L'équipe de Peter J. McHugh a cependant réussi à produire des versions tronquées contenant les acides aminés 6-328 ou 1-355 côté N-terminal (Allerston et al., 2015; Baddock et al., 2021; Sengerová et al., 2012). L'ensemble des études *in vitro* réalisées avec la forme entière ou tronquée montre que l'activité d'Apollo est efficace sur différents types de substrats ADN. En effet, Apollo est capable de digérer l'ADN simple brin et l'ADN double brin avec des extrémités franches ou protubérantes en 5' ou en 3' (Baddock et al., 2021; Lenain et al., 2006; Sengerová et al., 2012).

2 - Rôles d'Apollo dans les voies de réponses aux dommages de l'ADN

La protéine Apollo est impliquée dans la DDR activée en réponse à divers types de dommages, notamment les ICLs et DSBs. En effet, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit une augmentation de la sensibilité des cellules embryonnaires humaines HEK293T (Bae et al., 2008), des cellules cancéreuses humaines HeLa (Demuth et al., 2004), des fibroblastes humains PD20 (Mason & Sekiguchi, 2011) et des lymphocytes B de poulet DT40 (Ishiai et al., 2004) aux agents inducteurs d'ICLs tels que le cisplatine et la MMC. Apollo joue également un rôle dans la réponse aux DSBs, cependant, une augmentation de la sensibilité aux agents inducteurs de DSBs n'est pas retrouvée dans tous les types cellulaires. En effet, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* dans les cellules cancéreuses HeLa (Demuth et al., 2004) et U2OS (Salewsky et al., 2012) induit une augmentation de la sensibilité aux IR. En revanche, la

diminution du niveau d'expression d'*Apollo* dans les cellules HEK293T (Bae et al., 2008) et dans les cellules de poulet DT40 (Ishiai et al., 2004) n'impacte pas la sensibilité aux IR.

2.1 Apollo dans les voies de signalisation ATM/ATR et le cycle cellulaire

Apollo joue un rôle dans la signalisation de différents types de dommages de l'ADN, notamment en lien avec l'activation de la voie dépendante d'ATM en réponse aux ICLs et DSBs. En effet, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* dans les cellules embryonnaires humaines HEK293T exposées à la MMC induit une réduction du niveau de phosphorylation d'ATM et CHK2 (Bae et al., 2008). La phosphorylation d'ATM et de ses cibles p53 et H2AX est également réduite dans les fibroblastes humains GM00637 déplétés pour *Apollo* en réponse aux DSBs induites par les IR (Demuth et al., 2008). D'autre part, cette dernière étude montre une relocalisation de la protéine Apollo au niveau des sites des DSBs induits par micro-irradiations et ce, indépendamment de la phosphorylation d'ATM (Demuth et al., 2008). A l'inverse, Apollo ne co-localise pas avec les sites de dommages de l'ADN induits par les IR dans les fibroblastes humains BJ (Lenain et al., 2006; van Overbeek & de Lange, 2006). Malgré ces conclusions contradictoires concernant le recrutement d'Apollo sur les sites des DSBs, l'ensemble des données de la littérature indique un rôle d'Apollo en amont de la voie de signalisation ATM au cours de la signalisation des DSBs directs ou générés comme intermédiaires de réparation des ICLs.

Concernant la voie de signalisation dépendante d'ATR, les résultats relatifs au rôle d'Apollo diffèrent selon la source de dommages de l'ADN. En effet, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* dans les cellules embryonnaires humaines HEK293T exposées à la MMC n'impacte pas la phosphorylation de CHK1 (Bae et al., 2008). De manière similaire, la phosphorylation de CHK1 n'est pas impactée par la diminution d'expression d'*Apollo* dans les cellules cancéreuses de colon humain HCT116 soumises à un stress répliatif induit par l'aphidicoline, un inhibiteur de l'ADN polymérase (Mason et al., 2013). En revanche, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit une diminution du niveau de phosphorylation de CHK1 dans les fibroblastes humains GM00637 exposés aux UVC, suggérant un lien entre Apollo et la voie ATR dans ce contexte (Anders et al., 2009). Cette même étude montre qu'Apollo peut interagir avec les protéines HSC70 et HSP72, membres de la famille des protéines heat shock 70 (Heat Shock

Protein 70, HSP70), dans les cellules embryonnaires humaines HEK293T et que HSP72 favorise la formation de foci Apollo dans les cellules cancéreuses U2OS et dans les fibroblastes GM00637 (Anders et al., 2009). Les protéines heat shock régulent l'homéostasie protéique et jouent un rôle important dans la réponse aux stress cellulaires (Vos et al., 2008). D'autre part, la diminution de l'expression de *HSP72* induit une diminution du niveau de phosphorylation de CHK1 en réponse aux UVC dans les cellules cancéreuses HCT116 et HeLa (Gabai et al., 2008). D'après ces résultats, l'équipe d'Ilja Demuth suggère que les protéines HSP70 pourraient coopérer avec Apollo dans la réponse aux dommages de l'ADN (Anders et al., 2009).

Enfin, Apollo joue un rôle dans la signalisation de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à différents stress. En effet, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit un échappement du point de contrôle de la phase S des cellules HEK293T et HeLa exposées à la MMC (Bae et al., 2008) et des fibroblastes GM00637 exposées aux IR (Demuth et al., 2008). D'autre part, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* entraîne un échec du point de contrôle de la prophase des cellules HEK293T exposées au nocodazole, un inhibiteur de polymérisation des microtubules induisant un stress mitotique (L. Liu et al., 2009). Cette étude montre également qu'*Apollo* peut interagir avec l'astrine, une protéine de liaison aux microtubules, et que ces deux protéines co-localisent au niveau des centrosomes au cours de la mitose. Ces résultats suggèrent donc un rôle d'*Apollo* dans la régulation de la mitose dans les cellules HEK293T (L. Liu et al., 2009).

2.2 Liens entre Apollo et la voie FANC/BRCA

Les cellules déplétées pour *Apollo* arborent un phénotype ressemblant à celui des cellules de patients atteints de l'anémie de Fanconi. En effet, comme écrit précédemment, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* résulte en une sensibilité accrue des cellules humaines (Bae et al., 2008; Demuth et al., 2004; Mason & Sekiguchi, 2011) et de poulet (Ishiai et al., 2004) aux agents inducteurs d'ICLs. Au niveau moléculaire, Apollo interagit avec différents acteurs de la voie FANC/BRCA ou associés à cette voie dans les cellules HEK293T : FANCD2, MRE11, RAD50 (Bae et al., 2008), MUS81 (Bae et al., 2008; Stringer & Counter, 2012) et FANCP/SLX4 (Salewsky et al., 2012). D'autre part, Apollo fonctionne de manière épistatique avec FANCD2 et FANCI dans les cellules HeLa et les fibroblastes PD20 humains (Mason & Sekiguchi, 2011) et avec

FANCP/SLX4 dans les cellules U2OS (Salewsky et al., 2012) en réponse à la MMC, indiquant l'existence d'un rôle commun entre Apollo et la voie FANC/BRCA.

Sur le plan mécanistique, Apollo semble premièrement participer à la phase initiale de la voie FANC/BRCA en présence d'ICLs. En effet, bien que la mono-ubiquitinylation de FANCD2 soit indépendante d'Apollo dans les cellules HEK293T (Bae et al., 2008) et HeLa (Demuth et al., 2004; Mason & Sekiguchi, 2011), Apollo participe à la formation de foci FANCD2 en réponse aux ICLs dans les cellules HeLa. En effet, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit une diminution du nombre de foci FANCD2 formés dans ce contexte (Mason & Sekiguchi, 2011). D'autre part, Apollo est impliqué dans la phase de réparation des ICLs de la voie FANC/BRCA. En effet, Apollo participe à la formation de foci des protéines FANCS/BRCA1 et FANCR/RAD51 impliquées dans la voie de réparation des DSBs en réponse à la MMC dans les cellules HeLa (Mason & Sekiguchi, 2011). De plus, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit une réduction du niveau de cassures de l'ADN en réponse à la MMC dans les cellules HEK293T, suggérant un défaut de génération des DSBs au cours du processus de réparation des ICLs (Bae et al., 2008). Finalement, la déplétion d'*Apollo*, de manière similaire à la déplétion de *FANCD2*, provoque une diminution de la fréquence de réparation des DSBs par le mécanisme HR dans les cellules HeLa, suggérant qu'*Apollo* favorise ce mécanisme de réparation (Mason & Sekiguchi, 2011). Apollo semble également jouer un rôle en lien avec la voie FANC/BRCA en réponse au stress répliatif généré indépendamment des ICLs. En effet, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit une augmentation de la sensibilité des fibroblastes humains et des cellules HCT116 à l'aphidicoline, un inhibiteur de l'ADN polymérase. De manière similaire à la réponse aux ICLs, Apollo participe à la formation de foci FANCD2 (la mono-ubiquitinylation reste indépendante d'Apollo) et FANCS/BRCA1 dans les cellules HCT116 exposées à l'aphidicoline (Mason et al., 2013). D'autre part, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit une augmentation du nombre de cassures de l'ADN associées au stress répliatif endogène ou induit par l'aphidicoline dans les cellules HCT116. Ce dernier résultat suggère qu'*Apollo* participe globalement à la modération des effets du stress répliatif (Mason et al., 2013). L'idée d'un rôle d'Apollo en lien avec la réplication de l'ADN est également supportée par le fait qu'Apollo peut interagir avec PSF2, une protéine membre du complexe GINS

constituant l'hélicase CMG essentielle à la réplication de l'ADN, dans les cellules HEK293T (Stringer & Counter, 2012).

Collectivement, les résultats de la littérature indiquent donc un rôle d'Apollo lié à la voie FANC/BRCA se situant en aval de l'activation de l'hétérodimère ID2 et en amont de la réparation des DSBs. Bien que le rôle précis d'Apollo en lien avec la voie FANC/BRCA demeure indéterminé, trois mécanismes possibles et non exclusifs ont été proposés par différentes équipes.

En 2008, l'équipe de Randy J. Legerski propose un rôle d'Apollo dans l'effondrement contrôlé de la fourche de réplication au cours du processus de réparation des ICLs (Bae et al., 2008). Plus spécifiquement, les auteurs suggèrent qu'Apollo recrute ou maintient au niveau des ICLs l'endonucléase MUS81-EME1, laquelle participe à l'étape d'excision nécessaire à la génération du DSB (**Figure 16**). Ce modèle s'appuie sur le fait qu'Apollo peut interagir avec MUS81 (Bae et al., 2008; Stringer & Counter, 2012) et que la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit un défaut de génération des DSBs en réponse à la MMC (Bae et al., 2008). D'autre part, l'équipe de Randy J. Legerski argumente que l'activité exonucléase d'Apollo n'est pas nécessaire à la réparation des ICLs puisque le mutant *Apollo*^{D14N}, déficient pour cette activité, n'impacte pas l'excision d'une ICL intégrée dans un plasmide dans les cellules HEK293T (Bae et al., 2008).

Par la suite, l'équipe de JoAnn M. Sekiguchi propose un rôle d'Apollo dans la génération de régions d'ADN simple brin facilitant le recrutement de FANCD2 et de protéines de réparation en réponse aux ICLs et au stress répliatif. En effet, FANCD2 se lie préférentiellement aux régions d'ADN simple brin (Roques et al., 2009) et Apollo permet la formation de foci de FANCD2 en réponse à la MMC et à l'aphidicoline (Mason et al., 2013; Mason & Sekiguchi, 2011). D'autre part, le mutant *Apollo*^{D14N}, déficient pour l'activité exonucléase, compromet la formation de foci FANCD2 en réponse au stress répliatif induit par l'aphidicoline dans les cellules HCT116, ce qui suggère l'importance de cette activité pour l'assemblage de foci FANCD2 (Mason et al., 2013). L'équipe de JoAnn M. Sekiguchi suggère ainsi qu'Apollo intervient dans la digestion partielle 5' vers 3' du brin issu de la réplication indirecte de l'ADN

au niveau du site de blocage de la fourche pour faciliter le recrutement des protéines impliquées dans la réparation (**Figure 16**).

Finalement, l'étude *in vitro* des activités de SNM1A et Apollo montre que les deux exonucléases ont la capacité de digérer un substrat d'ADN double brin contenant une ICL au-delà de la lésion, suggérant qu'Apollo pourrait avoir un rôle redondant avec celui de SNM1A dans l'excision des ICLs (**Figure 16**). Néanmoins, la digestion par SNM1A semble plus efficace que celle d'Apollo dans ces essais *in vitro* (Sengerová et al., 2012). D'autre part, les cellules de poulet DT40 *DCLRE1A*^{-/-} et *DCLRE1B*^{-/-} présentent une sensibilité au cisplatine supérieure à celle des cellules *DCLRE1A*^{-/-} ou *DCLRE1B*^{-/-}. Ce dernier résultat montre que *DCLRE1A* et *DCLRE1B* sont non-épistatiques dans les cellules DT40 et favorise l'hypothèse selon laquelle SNM1A et Apollo exercent des fonctions différentes dans la réponse aux ICLs (Ishiai et al., 2004).

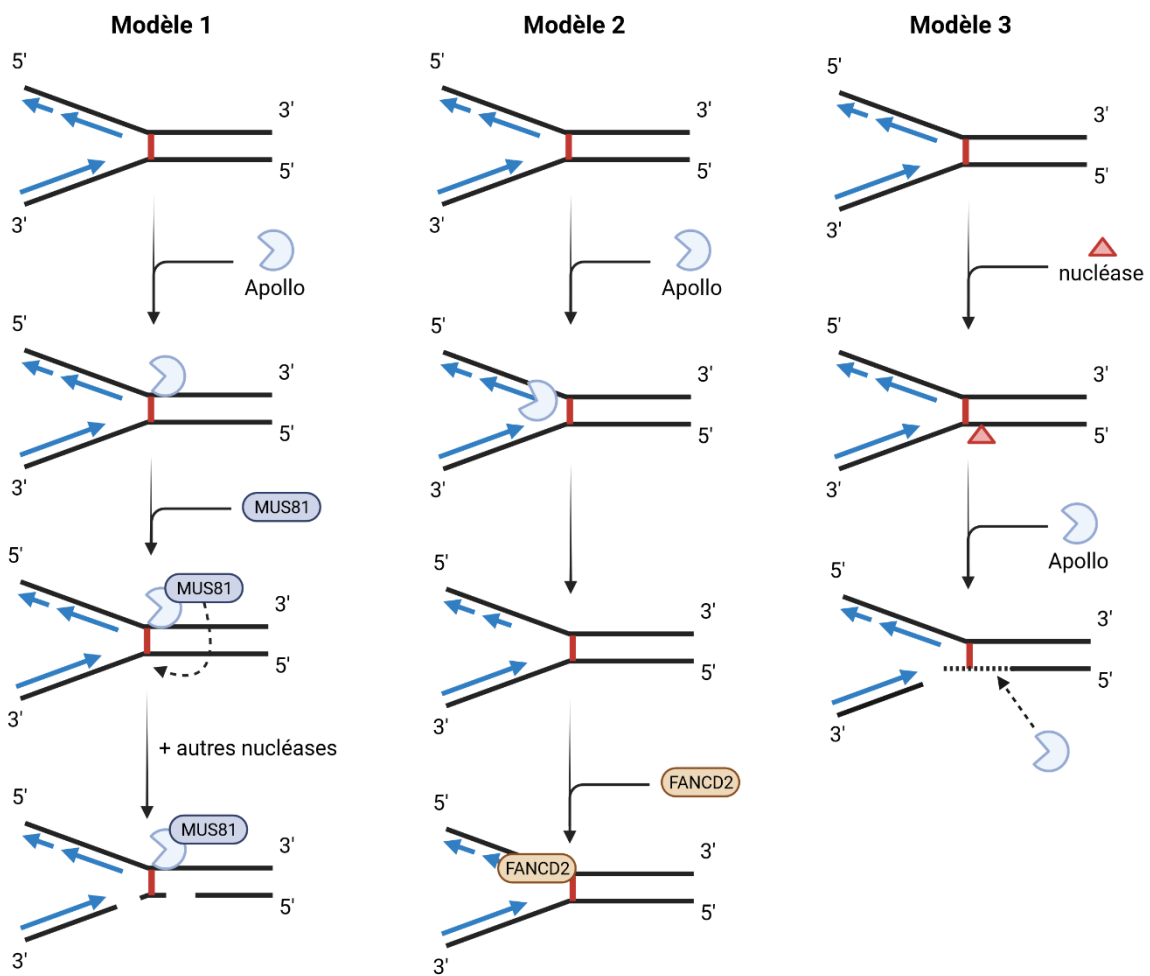


Figure 16 : Modèles proposés pour le mécanisme d'action d'Apollo dans la réparation des ICLs.

Le modèle 1 proposé par l'équipe de l'équipe de Randy J. Legerski suggère qu'Apollo intervient dans le recrutement ou le maintien au niveau des ICLs de l'endonucléase MUS81, laquelle participe à l'excision de l'ICL (Bae et al., 2008). Le modèle 2 proposé par l'équipe de JoAnn M. Sekiguchi suggère qu'Apollo intervient dans la digestion partielle 5' vers 3' du brin issu de la réplication indirecte de l'ADN au niveau du site de blocage de la fourche pour faciliter le recrutement des protéines impliquées dans la réparation, en particulier FANCD2 (Mason & Sekiguchi, 2011). Le modèle 3 propose que l'activité exonucléase d'Apollo intervient directement dans l'excision de l'ICL. Ce modèle est soutenu par le fait qu'Apollo possède la capacité de digérer ce type de substrat *in vitro* (Sengerová et al., 2012).

3 - Apollo dans le maintien des télomères

Les télomères correspondent à des complexes ADN-protéines situés aux extrémités des chromosomes. Les télomères jouent un rôle essentiel dans la préservation de l'intégrité génomique en protégeant les chromosomes de la dégradation et de la fusion des extrémités. Chez les mammifères, les télomères sont constitués de séquences 5'-TTAGGG-3' répétées sur plusieurs kilobases d'ADN double brin, avec une extrémité d'ADN simple brin terminale protubérante en 3', et liées par différentes protéines (de Lange, 2018; Gilson & Géli, 2007).

La dégradation de l'extrémité des chromosomes est un problème inhérent à la réplication de l'ADN et désigné comme le « end-replication problem » (de Lange, 2018). En effet, la réplication de l'ADN est réalisée dans le sens 5' vers 3' et nécessite une amorce ARN pour être initiée. En conséquence, l'extrémité 5' terminale des chromosomes demeure non répliquée, conduisant à la perte progressive des séquences télomériques à chaque cycle de réplication de l'ADN. En absence de mécanismes de maintien de la longueur des télomères, l'attrition progressive des chromosomes aboutit finalement à l'activation de la sénescence cellulaire ou de l'apoptose. La télomérase (Telomerase Reverse Transcriptase, TERT) est une transcriptase inverse qui compense le raccourcissement des télomères dans certaines cellules, en particulier dans les cellules germinales. La télomérase fonctionne en prolongeant l'extrémité 3' des chromosomes par transcription inverse de la matrice ARN constituée par l'ARN télomérase (Telomerase RNA Component, TERC) (Gilson & Géli, 2007; Hoeijmakers, 2001).

La fusion des extrémités est un problème associé au fait que l'extrémité des chromosomes sous forme linéaire s'apparentent à des dommages de l'ADN induisant l'activation des voies de signalisation et des mécanismes de réparation de la DDR. Ce problème est désigné comme le « end-protection problem » et est résolu par un ensemble de protéines regroupées en un complexe nommé « shelterin » (de Lange, 2018; Ghilain et al., 2021).

3.1 La protection des télomères par le complexe shelterin

Chez l'Homme, le complexe shelterin est constitué des six protéines TRF1 (Telomeric Repeat Factor 1), TRF2 (Telomeric Repeat Factor 2), RAP1 (Repressor-activator protein 1), TIN2 (TRF1-Interacting Nuclear protein 2), POT1 (Protection of Telomeres 1) et TPP1 (TIN2 and POT1

organizing protein) (de Lange, 2018; Ghilain et al., 2021). Chez la souris, la protéine POT1 comprend deux homologues identifiées comme Pot1a et Pot1b (Palm et al., 2009).

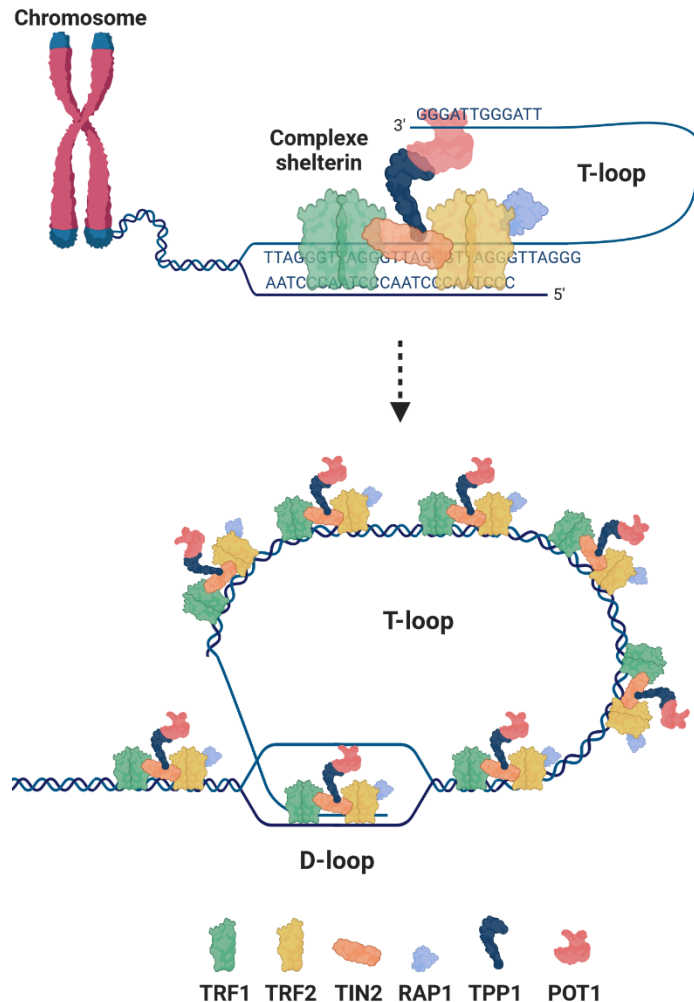


Figure 17 : Le complexe shelterin et la formation de la structure t-loop

Le complexe shelterin humain est constitué des six protéines TRF1, TRF2, RAP1, TPP1, TIN2 et POT1 (POT1a/b chez la souris). TRF1 et TRF2 se lient à l'ADN télomérique double brin sous forme d'homodimères tandis que POT1 se lie à l'extrémité d'ADN télomérique simple brin protubérante en 3'. TPP1 interagit avec POT1 et TIN2. TRF1 et TRF2 interagissent avec TPP1 par l'intermédiaire de TIN2. TRF2 interagit également avec RAP1. Le complexe shelterin induit la formation de la structure t-loop correspondant à l'invasion de l'ADN double brin télomérique par la région d'ADN simple brin protubérante en 3'. L'hybridation de cette région d'ADN double brin à la séquence complémentaire de l'ADN double brin télomérique provoque le déplacement du brin riche en guanines et crée une structure "D-loop". Adapté de (de Lange, 2018).

TRF1 et TRF2 se lient à l'ADN télomérique double brin par le biais de leur domaine Myb situé à l'extrémité C-terminale de chacune des protéines. Le domaine d'homologie des protéines TRF (TRF Homology domain, TRFH) médie quant à lui l'homodimérisation nécessaire à la liaison optimale de chacune des protéines TRF à l'ADN. De son côté, POT1 se lie à l'extrémité d'ADN télomérique simple brin protubérante en 3' par le biais de deux domaines N-terminaux de liaison aux oligonucléotides/oligosaccharides. Au niveau des interactions protéiques, TRF1 et TRF2 interagissent avec TIN2, laquelle interagit avec TPP1. Celle-ci interagit également avec POT1. Finalement, RAP1 interagit directement avec TRF2 (**Figure 17**) (de Lange, 2018; Ghilain et al., 2021).

3.1.1 Formation et protection de la t-loop

Le complexe shelterin induit le repliement de l'extrémité des télomères en une structure désignée "t-loop". La t-loop se prolonge avec l'invasion de l'ADN double brin télomérique par la région d'ADN simple brin protubérante en 3'. Celle-ci s'hybride au brin riche en cytosine provoquant le déplacement du brin riche en guanines et créant ainsi la formation d'une structure "D-loop" (**Figure 17**) (de Lange, 2018; Ghilain et al., 2021).

Parmi les membres du shelterin, TRF2 apparaît comme la seule protéine nécessaire et suffisante pour induire la formation de la t-loop (Doksani et al., 2013). Le domaine TRFH de TRF2 comporte plusieurs résidus lysines et arginines créant des liaisons de faible affinité avec l'ADN double brin. Ces liaisons permettent l'enroulement de région ~90pb d'ADN télomérique double brin autour du domaine TRFH de TRF2 et participent au changement conformationnel nécessaire pour la formation de la t-loop. En effet, cette propriété d'enroulement de TRF2 catalyse le super-enroulement positif de l'ADN télomérique, favorisant ainsi l'ouverture de l'ADN double brin non liée par TRF2 et stimulant l'invasion de l'extrémité 3' simple brin télomérique (Amiard et al., 2007; Benarroch-Popivker et al., 2016).

Hormis les domaines TRFH et Myb, TRF2 interagit avec l'ADN double brin par le biais de son domaine basique N-terminal (Amiard et al., 2007; Fouché et al., 2006; Schmutz et al., 2017). Celui-ci se lie spécifiquement aux structures de l'ADN en embranchements et permet l'interaction entre TRF2 et la base de la t-loop (Fouché et al., 2006; Schmutz et al., 2017). Cette interaction exerce un effet complémentaire à l'enroulement de l'ADN autour du domaine TRFH

de TRF2 et favorise ainsi la formation de la t-loop (Fouché et al., 2006). La liaison entre le domaine basique N-terminal de TRF2 et l'ADN joue également un rôle important dans le maintien de la longueur des télomères. En effet, l'absence d'interaction entre TRF2 et la base de la t-loop induit le déplacement de l'extrémité d'ADN simple brin protubérante en 3' et la transformation de la D-loop en une structure de type dHJ (Schmutz et al., 2017). Cette structure correspond à un intermédiaire du mécanisme de réparation HR pouvant être clivé par les endonucléases MUS81, SLX4-SLX1 ou GEN1 (Ip et al., 2008; Saint-Léger et al., 2014; Svendsen et al., 2009). En conséquence, l'inhibition de la liaison du domaine basique N-terminal de TRF2 induit le clivage de la t-loop par le mécanisme HR et aboutit à la perte de protection et au raccourcissement des télomères (Schmutz et al., 2017; R. C. Wang et al., 2004).

3.1.2 La répression des voies de signalisation de la DDR par le shelterin

Les voies de signalisation ATM et ATR peuvent toutes deux être activées en réponse à un défaut de protection des télomères. Parmi les membres du complexe shelterin, TRF2 est la protéine majoritairement responsable de l'inhibition d'ATM tandis que POT1 (ou Pot1a et Pot1b) est responsable de l'inhibition d'ATR (de Lange, 2018; Denchi & de Lange, 2007; Ghilain et al., 2021).

La formation de la t-loop dépendante de TRF2 est un mécanisme fondamental de l'inhibition de l'activation d'ATM à l'encontre des télomères (Benarroch-Popivker et al., 2016; Van Ly et al., 2018). D'autres mécanismes d'inhibition sont cependant décrits dans la littérature (Ghilain et al., 2021). En particulier, l'activation d'ATM dépend du statut de phosphorylation du résidu sérine 432 (ou 433 chez la souris) de NBS1 (NBS1^{S432}). En effet, la phosphorylation de NBS1^{S432} en absence de TRF2 est nécessaire à l'activation de la voie ATM (Rai et al., 2017).

La voie de signalisation ATR peut également être activée à l'encontre des télomères en raison de la présence de la région d'ADN simple brin terminale protubérante en 3'. L'activation d'ATR aux télomères est inhibée par POT1 chez l'humain et Pot1a chez la souris (Denchi & de Lange, 2007; Hockemeyer et al., 2006). Au niveau mécanistique, POT1 agit en inhibant la liaison concurrentielle de RPA à la région d'ADN télomérique simple brin (de Lange, 2018; Ghilain et al., 2021). Tout comme pour l'activation d'ATM en réponse à l'inhibition de TRF2, NBS1 joue un rôle dans l'activation de la voie ATR à l'encontre des télomères dépourvus de POT1 puisque

cette activation nécessite la déphosphorylation de NBS1^{S432} (Rai et al., 2017). Le statut de phosphorylation de NBS1^{S432} est donc un facteur déterminant de l'activation des voies de signalisation ATM et ATR suite à la perte de protection des télomères.

3.1.3 La répression des mécanismes de réparation de la DDR par le shelterin

En absence de protection par le complexe shelterin, les télomères sont identifiés comme des dommages de l'ADN et deviennent la cible des mécanismes de réparation des DSBs, aboutissant à des fusions chromosomiques (de Lange, 2018; Ghilain et al., 2021).

L'inhibition du mécanisme de réparation c-NHEJ à l'encontre des télomères dépend majoritairement de TRF2. Parmi les membres du shelterin, TRF2 est donc plus particulièrement la protéine responsable de la double répression de la signalisation ATM et du mécanisme c-NHEJ aux télomères (Denchi & de Lange, 2007; Rai et al., 2010). Différents mécanismes peuvent expliquer la répression du c-NHEJ par TRF2 dont la formation de la t-loop (de Lange, 2018; Ghilain et al., 2021). En effet, la formation de la t-loop par TRF2 est suggérée constituer une barrière physique à la liaison de l'hétérodimère Ku70-Ku80 avec l'extrémité des télomères (de Lange, 2018). D'autre part, TRF2 interagit avec Ku70 et cette interaction est proposée comme un autre mécanisme inhibant la mise en place du c-NHEJ au niveau des télomères (Ribes-Zamora et al., 2013). Hormis son rôle dans l'activation d'ATM, le complexe MRN est également nécessaire à la formation des fusions télomériques induites par la perte de TRF2 (Deng et al., 2009; Dimitrova & de Lange, 2009). Dans ce contexte, l'interaction entre TRF2 et la forme non-phosphorylée de NBS1^{S432} participe non seulement à l'inhibition de l'activation d'ATM, mais également à l'inhibition des fusions dépendantes du c-NHEJ au cours de la phase G1 du cycle cellulaire (Rai et al., 2017). Enfin, la protéine RAP1 participe à la protection des télomères contre l'activation du c-NHEJ en cas de non formation de la t-loop et renforce ainsi la protection globale des télomères. En revanche, RAP1 ne permet pas d'inhiber la voie de signalisation ATM et la seule absence de RAP1 n'induit pas de fusions télomériques (Benarroch-Popivker et al., 2016; Sfeir et al., 2010).

Le c-NHEJ apparaît comme le mécanisme de réparation primaire activé en réponse à un défaut de TRF2. Cependant, en cas d'une double inhibition de TRF2 et du c-NHEJ, l'activation du mécanisme alt-EJ représente une menace alternative aboutissant également à des fusions

chromosomiques (Rai et al., 2010; Sfeir & de Lange, 2012). Dans ce contexte, le dimère Tpp1-Pot1a/b inhibe les fusions télomériques résultantes du alt-EJ et dépendantes de la voie de signalisation ATR et de l'intervention de CtIP. Les protéines Tpp1-Pot1a/b constituent donc une seconde barrière de défense contre les fusions télomériques en cas de défaut du mécanisme c-NHEJ (Denchi & de Lange, 2007; Rai et al., 2010).

Les télomères étant caractérisés par la présence d'une région d'ADN simple brin avec des séquences communes, ils sont assimilés aux structures d'ADN ciblées par le mécanisme de réparation HR. En absence de protection de cette région d'ADN simple brin, l'activation du mécanisme HR aux télomères favorise les échanges de chromatides sœurs et le risque de raccourcissement incontrôlé et asymétrique en cas d'échange de portions inégales (de Lange, 2018). L'inhibition du mécanisme HR à l'encontre des régions d'ADN simple brin télomériques protubérantes en 3' dépend essentiellement de la liaison protectrice de POT1 (Glousker et al., 2020). Néanmoins, Rap1 intervient également dans l'inhibition de mécanisme HR chez la souris (Sfeir et al., 2010).

3.1.4 Les rôles du complexe shelterin dans la réplication des télomères

L'ADN télomérique a la capacité de former de nombreuses structures qui constituent des barrières à la progression de la réplication. Ces structures incluent notamment la t-loop et les structures G-quadruplex, lesquelles peuvent facilement se former au niveau télomères en raison de la richesse en guanines du brin télomérique constitué de la répétition de séquence TTAGGG. En conséquence, les télomères sont soumis à un stress répliatif endogène et sont comparés aux sites fragiles de la réplication du génome. Ainsi, le phénotype associé à un défaut de résolution du stress répliatif télomérique est caractérisé par l'apparition de signaux télomériques multiples (Multi-Telomeric Signals, MTS) et qualifié de « phénotype des télomères fragiles ». L'apparition de fusions entre chromatides sœurs et la formation de pont inter-chromosomiques au cours de la mitose sont également des manifestations caractéristiques du stress répliatif télomérique (Gilson & Géli, 2007; Higa et al., 2017; Sfeir et al., 2009).

Les hélicases de la famille RecQ jouent un rôle essentiel dans la résolution du stress répliatif télomérique et cette fonction s'exerce en collaboration avec les membres du complexe

shelterin, en particulier TRF1 et TRF2 (Gilson & Géli, 2007; Higa et al., 2017). En effet, TRF1 inhibe le phénotype des télomères fragiles selon un mécanisme proposé comme dépendant de son recrutement de BLM, une hélicase de la famille RecQ capable de résoudre différentes structures dont les G-quadruplex (Sfeir et al., 2009; Zimmermann et al., 2014). De son côté, TRF2 est capable de se lier à différents types de structures de l'ADN problématiques pour la réplication et de recruter différentes enzymes, dont des hélicases de la famille RecQ, impliquées dans la résolution de ces structures (Ghilain et al., 2021). Parmi les hélicases de la famille RecQ, TRF2 recrute et stimule l'activité des hélicases BLM et WRN (Opresko et al., 2002) et recrute l'hélicase RTEL1, impliquée dans le désassemblage de la t-loop au cours de la phase S (Sarek et al., 2015). Hormis ces hélicases, TRF2 interagit avec des nucléases dont SLX4, interagissant elle-même avec les endonucléases SLX1, XPF-ERCC1 et MUS81 (Svendsen et al., 2009), et l'endonucléase FEN1 (Flap Endonuclease 1) (Saharia et al., 2008).

3.2 Rôles d'Apollo en lien avec le complexe shelterin

3.2.1 Apollo : une protéine associée au shelterin

Apollo interagit avec le domaine TRFH de TRF2 (Freibaum & Counter, 2006; Lenain et al., 2006; van Overbeek & de Lange, 2006) *via* les 37 derniers acides aminés de son extrémité C-Terminale (496-532) (Freibaum & Counter, 2006). D'autre part, Apollo existe en partie sous forme de foci aux niveaux des télomères (Demuth et al., 2008; Freibaum & Counter, 2006; Lenain et al., 2006; van Overbeek & de Lange, 2006) et cette localisation dépend de son recrutement par TRF2 (Freibaum & Counter, 2006; Lenain et al., 2006). L'interaction entre Apollo et TRF2 participe également à la stabilisation de la protéine Apollo dans les cellules embryonnaires humaines HEK293T (Freibaum & Counter, 2008). Cet effet n'est cependant pas observé dans les cellules embryonnaires de souris MEFs (P. Wu et al., 2010).

Apollo apparaît comme une protéine importante pour l'inhibition de la DDR aux télomères. Ainsi, la déplétion (Lenain et al., 2006; van Overbeek & de Lange, 2006; Ye et al., 2010) ou la délétion (Kermasson et al., 2022; Lam et al., 2010; P. Wu et al., 2010) d'*Apollo* induit la formation de TIFs (Telomere dysfunction-Induced Foci) illustrés par la co-localisation de foci 53BP1 et γ H2AX avec les télomères. La DDR induite par la délétion conditionnelle d'*Apollo* dans les MEFs est caractérisée par l'activation de la voie de signalisation dépendante d'ATM (P. Wu et al.,

2010). D'autre part, la délétion d'*Apollo* induit une augmentation du pourcentage d'aberrations télomériques, en particulier des fusions chromosomiques, dans les MEFs (Akhter et al., 2010; Lam et al., 2010; P. Wu et al., 2010) et dans les cellules cancéreuses humaines HT1080 (Kermasson et al., 2022). Dans les MEFs, ces fusions dépendent de la protéine Ku70 et donc du mécanisme c-NHEJ (Lam et al., 2010).

En raison de son interaction avec TRF2 et son rôle dans la répression de la DDR aux télomères, *Apollo* est considérée comme une protéine associée au shelterin. Les mécanismes à l'origine de la protection des télomères dépendante d'*Apollo* sont associés à ses activités dans la génération de la région d'ADN télomérique simple brin protubérante en 3' et dans la réplication des télomères.

3.2.2 Rôle d'*Apollo* dans la génération de la région d'ADN télomérique protubérante en 3'

La formation de la région d'ADN télomérique simple brin protubérante en 3' est une étape essentielle à la formation de la t-loop puisque nécessaire à la liaison de POT1 (ou POT1a/POT1b) à l'ADN télomérique. Cette étape présente la particularité d'être différente entre les brins télomériques issus de la réplication directe (brin « leading ») et indirecte (brin « lagging ») de l'ADN. En effet, l'extrémité 3' protubérante des télomères « lagging » est *a priori* générée spontanément en raison de l'incapacité du processus de réplication indirecte à répliquer entièrement la région terminale des télomères. A l'inverse, la réplication directe de l'ADN permet une réplication complète de l'extrémité télomérique et aboutit initialement à des télomères « leading » comportant des extrémités franches. La génération de l'extrémité protubérante en 3' des télomères « leading » nécessite donc une étape supplémentaire spécifique. Cette étape repose sur l'intervention d'exonucléases 5' vers 3' permettant la digestion d'une partie du brin matrice utilisé pour la réplication de l'ADN (de Lange, 2018; Gilson & Géli, 2007). Plusieurs exonucléases possèdent l'activité nécessaire à cette digestion et sont donc susceptibles d'intervenir dans cette étape. Chez les mammifères, *Apollo* est l'exonucléase plus particulièrement suggérée comme impliquée dans ce mécanisme (de Lange, 2018).

Au niveau chromosomique, un défaut de génération de l'extrémité télomérique protubérante en 3' se traduit à la fois par une réduction de la taille de cette extrémité et par des fusions

ciblant spécifiquement les télomères « leading ». Ce phénotype est notamment observé en absence d'Apollo. En effet, la quasi-totalité des fusions télomériques induites par la délétion d'Apollo dans les MEFs sont des fusions entre télomères « leading » (Lam et al., 2010; P. Wu et al., 2010). La délétion d'Apollo induit également une réduction de l'extrémité 3' protubérante des télomères dans les MEFs (Akhter et al., 2010; P. Wu et al., 2010, 2012) et dans les cellules HT1080 humaines (Kermasson et al., 2022). Au niveau mécanistique, l'interaction avec TRF2 et l'activité exonucléase 5' vers 3' d'Apollo apparaissent comme nécessaires à son activité de protection. En effet, des mutants d'Apollo déficients pour l'interaction avec TRF2 ou l'activité nucléase ne permettent pas d'éliminer les fusions télomériques ni de compenser la réduction de l'extrémité 3' protubérante observées dans les MEFs *Apollo*^{-/-} (Lam et al., 2010; P. Wu et al., 2010). Finalement, la protéine Apollo humaine est capable d'utiliser son activité exonucléase pour digérer un substrat d'ADN double brin *in vitro* et TRF2 stimule cette activité (Lenain et al., 2006; Ye et al., 2010). L'ensemble de ces résultats constituent la base du modèle actuel selon lequel Apollo participe à la génération de l'extrémité 3' protubérante des télomères « leading » suite à la réplication de l'ADN.

Les travaux de l'équipe de Titia de Lange réalisés dans les MEFs montre que ce modèle implique également des interactions fonctionnelles entre Apollo, Pot1b et Exo1 dans les cellules de souris. En effet, leurs résultats montrent que Pot1b limite la digestion dépendante d'Apollo de façon à préserver l'intégrité des télomères. D'autre part, l'activité exonucléase d'Exo1 prolonge la digestion des télomères « leading » initiée par Apollo afin d'augmenter la longueur de l'extrémité 3' protubérante. Finalement, la re-synthétisation d'une partie du brin digéré est réalisée par l'ADN polymérase α interagissant avec le complexe CST (Ctc1-Stn1-Ten1) recruté par Pot1b. Cette dernière étape permet d'établir la longueur définitive de l'extrémité d'ADN télomérique simple brin protubérante en 3' au cours de la phase G1 (P. Wu et al., 2012). Dans ce modèle, l'équipe de Randy Legerski propose en particulier que la digestion 5' vers 3' initiale catalysée par Apollo permet la génération de la région d'ADN télomérique simple brin nécessaire à la liaison de Pot1b qui, une fois lié aux télomères, inhibe l'action d'Apollo (Lam et al., 2010) (**Figure 18**).

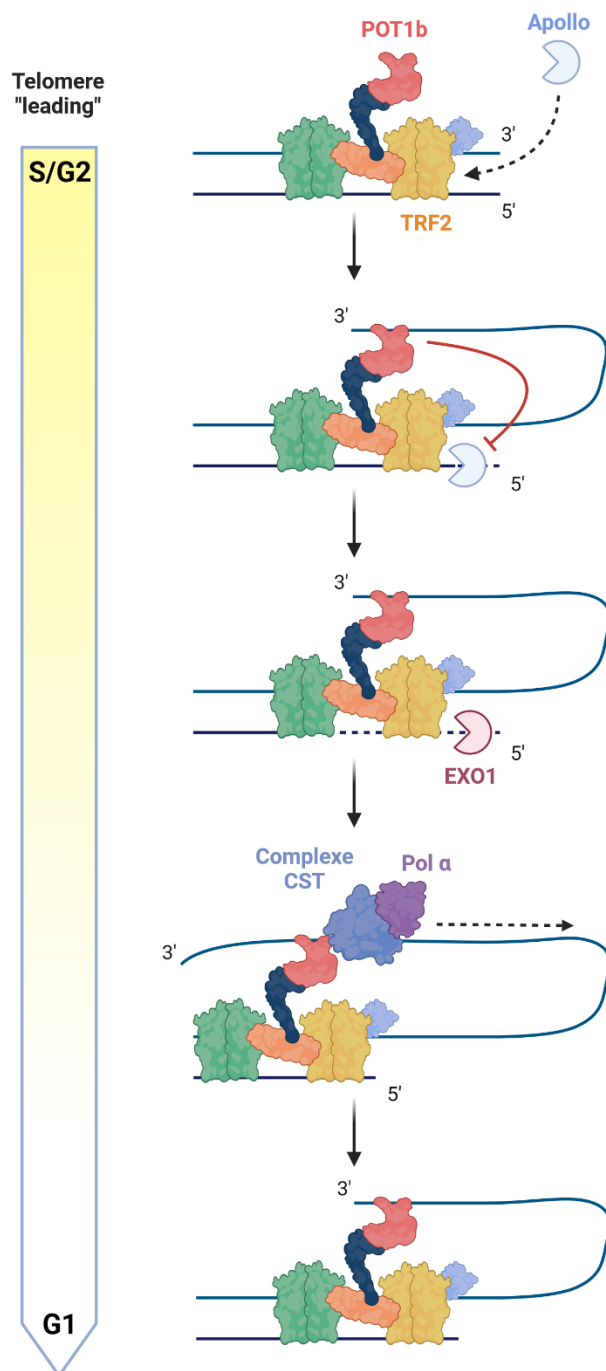


Figure 18 : L'activité d'Apollo dans la génération de l'extrémité 3' protubérante des télomères en coopération avec POT1b et EXO1 dans les MEFs.

L'interaction entre Apollo et Trf2 médie le recrutement d'Apollo au niveau des télomères. Suite à la réplication des télomères, Apollo amorce la digestion 5' vers 3' des télomères « leading » permettant la génération de la région d'ADN télomérique simple brin nécessaire à la liaison de Pot1b. Une fois lié aux télomères, Pot1b inhibe la digestion de l'ADN par Apollo. L'élongation de

la région d'ADN télomérique simple brin est réalisée par l'exonucléase Exo1 qui prolonge la digestion amorcée par Apollo. Enfin, la re-synthétisation d'une partie du brin digéré est réalisée par l'ADN polymérase α interagissant avec le complexe CST (Ctc1-Stn1-Ten1) recruté par Pot1b. Cette dernière étape permet d'établir la longueur définitive de l'extrémité d'ADN télomérique simple brin protubérante en 3' au cours de la phase G1. Figure adaptée de (de Lange, 2018).

D'autre part, l'étude de l'équipe de Sandy Chang montre l'existence d'une régulation de l'activité d'Apollo aux télomères dépendante du statut de phosphorylation de NBS1^{S432} dans les cellules cancéreuses humaines U2OS (Rai et al., 2017). En effet, les résultats de cette étude montrent que la forme non-phosphorylée de NBS1^{S432} entre en compétition avec Apollo pour la liaison à TRF2 et est favorisée par rapport à Apollo. D'autre part, la modification de NBS1^{S432} est étroitement liée au cycle cellulaire puisque la cycline CDK2 catalyse la phosphorylation de NBS1 au cours des phases S/G2 tandis que la phosphatase PP1- α (Protein Phosphatase 1 alpha) catalyse sa déphosphorylation au cours de la phase G1. Ainsi, l'équipe de Sandy Chang propose un modèle dans lequel NBS1 régule le recrutement d'Apollo par TRF2 aux télomère et conditionne la formation de l'extrémité télomérique 3' protubérante en fonction du cycle cellulaire. Dans ce modèle, NBS1^{S432} non-phosphorylé interagit avec TRF2 au cours de la phase G1 du cycle, empêchant l'interaction entre TRF2 et Apollo (ainsi que l'activation d'ATM et du c-NHEJ). A l'inverse, la phosphorylation de NBS1^{S432} au cours des phases S/G2 entraîne sa dissociation de TRF2, permettant le recrutement d'Apollo aux télomères et la génération de l'extrémité 3' protubérante (Rai et al., 2017) (**Figure 19**). Dans la prolongation de ce modèle, l'étude de l'équipe de Christophe Lachaud montre que la phosphorylation de NBS1 dépend de l'UFMylation de MRE11 dans les cellules humaines HeLa (Lee et al., 2021). En effet, l'UFMylation de MRE11 favorise l'interaction entre la phosphatase PP1- α et le complexe MRN, induisant la déphosphorylation de NBS1 et l'inhibition de l'interaction entre TRF2 et Apollo. A l'inverse, la délétion du gène *UFL1* (UFM1 Specific Ligase 1), dont la protéine est nécessaire à l'UFMylation de MRE11, favorise l'association entre Apollo et TRF2 (Lee et al., 2021) (**Figure 19**).

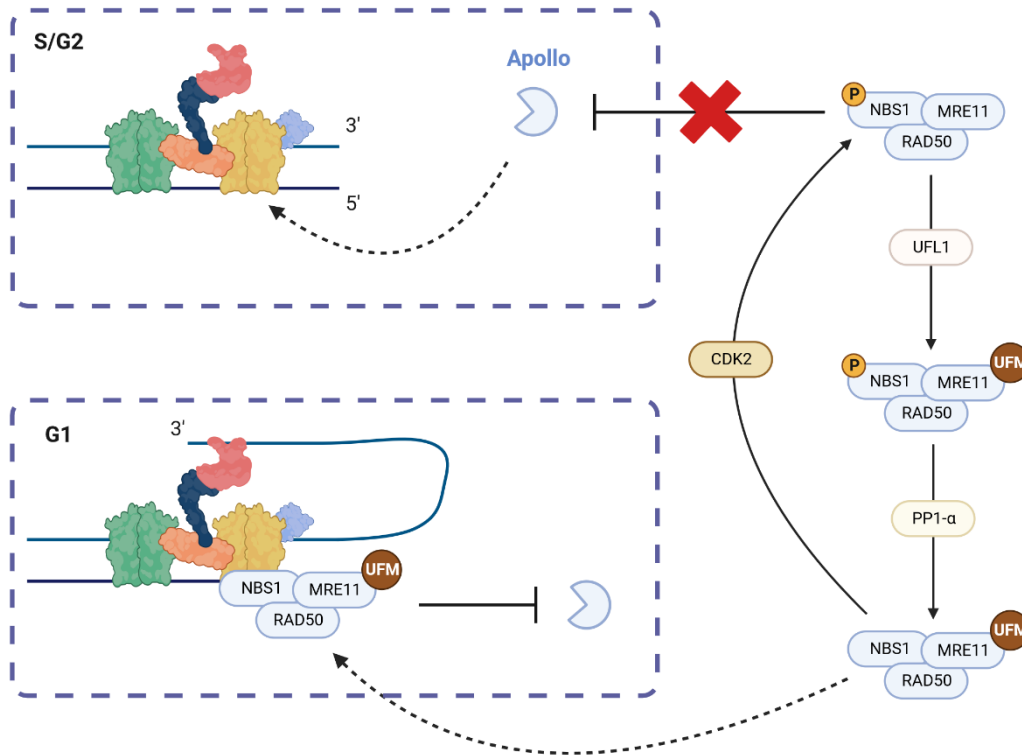


Figure 19 : La régulation de l'activité d'Apollo aux télomères en fonction de l'interaction entre TRF2 et NBS1 dans les cellules humaines.

La phosphorylation de NBS1^{S432} au cours des phases S/G2 par CDK2 entraîne sa dissociation de TRF2, permettant le recrutement d'Apollo aux télomères et la génération de l'extrémité 3' protubérante. A l'inverse, la forme NBS1^{S432} non-phosphorylée interagit avec TRF2 au cours de la phase G1 du cycle et empêche l'interaction entre TRF2 et Apollo. Cette déphosphorylation de NBS1 en G1 est catalysée par le phosphatase PP1-α et nécessite au préalable l'UFMylation de MRE11 par UFL1.

3.2.3 Rôle d'Apollo dans la réplication des télomères

L'ADN télomérique peut former de nombreuses structures qui constituent des obstacles s'opposant à la progression de la réplication de l'ADN comme la t-loop ou les structures G-quadruplex. Ainsi, l'approche de la fourche de réplication vers ces structures induit l'accumulation de super-enroulements positifs de l'ADN favorisant le ralentissement ou l'arrêt de la fourche. Cet effet est plus précisément qualifié de stress topologique (Gilson & Géli, 2007; Higa et al., 2017). Les travaux de l'équipe d'Éric Gilson montrent que l'activité exonucléase d'Apollo joue un rôle dans la résolution du stress topologique des télomères en coopération avec TRF2 dans les cellules humaines HT1080 (Ye et al., 2010). En effet, la surexpression de mutants d'Apollo dépourvu d'activité nucléase dans les cellules HT1080 induit un défaut de résolution du stress répliatif télomérique illustré par l'apparition du « phénotype des télomères fragiles » (MTS), des fusions de chromatides sœurs, une augmentation des pertes de signaux télomériques et un ralentissement de la réplication des télomères. Le mécanisme d'action d'Apollo dans ce contexte demeure indéfini mais s'exerce en coopération avec TRF2, lequel possède la capacité de se lier à l'ADN télomérique avec un super-enroulement positif. D'autre part, l'activité d'Apollo et TRF2 peut partiellement se substituer à celle de la topoisomérase II alpha, impliquée dans la résolution du stress topologique. A partir de l'ensemble de ces résultats, l'équipe d'Éric Gilson suggère le modèle suivant : TRF2 détecte les super-enroulements positifs de l'ADN télomérique induit par le stress topologique et permet le recrutement d'Apollo, lequel participe à la résolution du stress grâce à son activité exonucléase. Les auteurs proposent également deux mécanismes moléculaires possibles : TRF2 et Apollo (i) préviennent la formation ou élimine les structures à l'origine du stress topologique et/ou (ii) inhibe la réversion de la fourche de réplication afin de la stabiliser et de laisser le temps aux topoisomérases de résoudre le stress topologique (Ye et al., 2010) **(Figure 20)**.

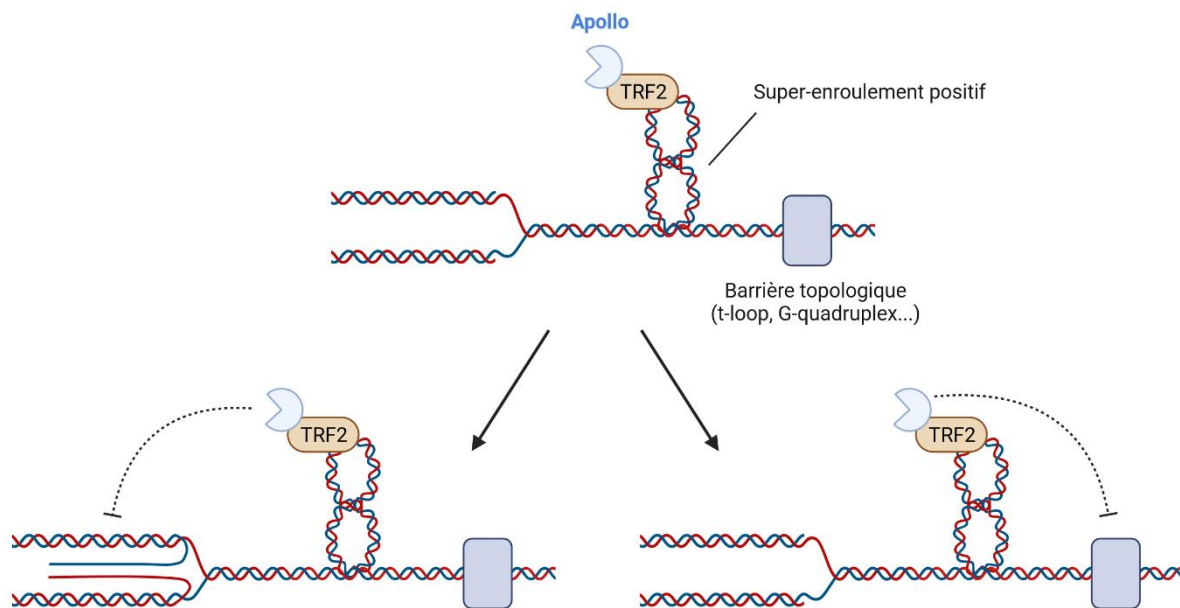


Figure 20 : L'activité d'Apollo dans la résolution du stress topologique des télomères dans les cellules humaines.

L'ADN télomérique est soumis au stress topologique induit par la présence de structures constituant des obstacles à la réplication de l'ADN comme la t-loop ou les structures G-quadruplex. L'activité exonucléase d'Apollo joue un rôle dans la résolution du stress topologique des télomères en coopération avec TRF2, lequel se lie au super-enroulements positifs de l'ADN télomérique. Le mécanisme d'action d'Apollo demeure inconnu mais nécessite son activité exonucléase. Deux mécanismes sont donc proposés : TRF2 et Apollo (i) préviennent la formation ou élimine les structures à l'origine du stress topologique et/ou (ii) inhibe la réversion de la fourche de réplication afin de la stabiliser.

4 - Associations entre *Apollo* et pathologies

Les pathologies télomériques (Telomere Biology Disorders, TBDs) regroupent l'ensemble des pathologies induites par un raccourcissement accéléré et/ou une instabilité des télomères. Les TBDs sont classés en plusieurs sous-types de pathologies incluant la dyskératose congénitale (DC), le syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson (HH), le syndrome de Coats et le syndrome de Revesz. Les pathologies pulmonaires de l'adulte telle que la fibrose pulmonaire sont également incluses dans les TBDs et en constituent la forme la plus fréquente. Les TBDs recouvrent une multitude de phénotypes cliniques variables en fonction du sous-type de pathologies et des individus. La DC se caractérise principalement par une déplétion progressive des cellules

souches hématopoïétiques (Bone Marrow Failure, BMF) et un vieillissement prématuré (Revy et al., 2023). De plus, la DC prédispose au développement de cancers, en particulier la leucémie myéloïde aigüe (Acute Myeloid Leukemia, AML) et différents types de cancers solides, principalement les carcinomes squameux de la tête et du cou (Head and Neck Squamous Carcinoma, HNSC) et de la région anale (Alter et al., 2009, 2018). Les syndromes de HH, Coats et Revesz constituent quant à eux les formes les plus sévères de TBDs et se déclarent de manière précoce. Le syndrome de HH en particulier est généralement présent dès la naissance et se caractérise par un retard de croissance, une microcéphalie, une hypoplasie cérébelleuse (retard de développement du cervelet) et une sévère BMF (Revy et al., 2023).

Actuellement, 17 gènes sont décrits comme responsables de TBDs et se répartissent dans quatre catégories : les gènes codant des protéines membres du complexe de la télomérase, les gènes codant des protéines impliquées dans la structuration de l'ARN télomérase, les gènes codant des protéines membres du complexe shelterin et les gènes codant des facteurs accessoires de la stabilité et de la réplication des télomères. Le gène *Apollo* est inclus dans cette dernière catégorie et son altération conduit au développement du syndrome de HH (Revy et al., 2023). En effet, quatre cas de patients atteints du syndrome de HH associé à un défaut d'*Apollo* sont rapportés dans la littérature par l'équipe de Patrick Revy (Kermasson et al., 2022; Touzot et al., 2010).

Le premier cas clinique décrit un variant d'épissage alternatif intra-exonique d'*Apollo* sans mutation de la séquence ADN, résultant en une forme tronquée en C-terminale et dépourvue du domaine de liaison à TRF2. La patiente est une enfant présentant différents traits phénotypiques caractéristiques du syndrome de HH incluant un retard de croissance intra-utérin, une microcéphalie, une hypoplasie cérébelleuse, un déficit en lymphocytes B et une anémie aplasique. Cette patiente est décédée à l'âge de 4 ans des suites d'une infection. Au niveau cellulaire, cet ARNm *Apollo* Δ induit une diminution de la prolifération associée à une induction de la sénescence des fibroblastes humains. Au niveau chromosomique, *Apollo* Δ est associé la formation de TIFs et de dommages télomériques de type MTS et fusions sans diminution de la longueur moyenne des télomères. En revanche, *Apollo* Δ n'induit pas de sensibilité accrue aux agents inducteurs d'ICLs et DSBs. De manière intéressante, *Apollo*

possède la capacité de s'homodimériser et la forme *Apollo* Δ maintient cette capacité à dimériser avec la forme sauvage dans les fibroblastes humains (Touzot et al., 2010; van Overbeek & de Lange, 2006). Dans cette étude, les auteurs suggèrent donc qu'un effet dominant négatif exercé par *Apollo* Δ constitue le mécanisme à l'origine de la pathologie (Touzot et al., 2010).

Dans une étude récente, l'équipe de Patrick Revy décrit trois autres cas de patients atteints du syndrome de HH associés à des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites d'*Apollo*. Deux patients sont ainsi porteurs d'une mutation faux-sens substituant la leucine 142 par une phénylalanine (L142F) ou une sérine (L142S) associée à un codon stop prématuré sur le second allèle (mutations hétérozygotes composites *Apollo*^{R122stop/L142F} ou *Apollo*^{R582stop/L142S}) tandis que le dernier patient est porteur de la mutation faux-sens L142S sur les deux allèles (mutation homozygote *Apollo*^{L142S}). Bien que non-localisées dans la région d'interaction avec TRF2, les deux mutations L142F et L142S induisent une diminution de la capacité d'interaction d'*Apollo* avec TRF2 dans les cellules HEK293T. De manière similaire à *Apollo* Δ , l'expression de ces mutants d'*Apollo* induit une augmentation du pourcentage de fusions télomériques sans réduction de la longueur moyenne des télomères des fibroblastes humains. D'autre part, l'expression des mutants *Apollo*^{L142F} et *Apollo*^{L142S} est associée à une réduction de la longueur de l'extrémité d'ADN télomérique protubérante en 3'. En revanche, contrairement à *Apollo* Δ , les cellules exprimant *Apollo*^{L142F} et *Apollo*^{L142S} présentent une sensibilité accrue aux agents inducteurs d'ICLs, de DSBs et de stress réplicatif. Dans cette étude, les auteurs constatent que le phénotype des cellules de patients demeurent moins exacerbé que celui de cellules *Apollo*^{-/-} et proposent ainsi que les mutants sont hypomorphes, c'est-à-dire qu'ils conservent la fonction de la protéine sauvage mais de manière réduite (Kermasson et al., 2022).

Ces deux études cliniques et fonctionnelles démontrent le caractère essentiel d'*Apollo* dans le maintien des télomères à l'échelle d'un organisme entier. Cette idée est renforcée par le fait que la délétion du gène *Apollo* induit une mortalité périnatale chez 100% des souris *Apollo*^{-/-} associée à un retard ou un arrêt de développement. En parallèle, les MEFs issus de ces souris présentent une augmentation du pourcentage de fusions télomériques (Akhter et al., 2010).

D'autre part, plusieurs variants d'*Apollo* ont été associés à certains types de cancers dans des études de séquençage à haut-débit : le variant rs11552449 associé au cancer du sein (Caswell et al., 2015; Michailidou et al., 2013), le variant rs12046289 associé au mélanome (Liang et al., 2012), le variant rs974404 associé aux cancers de la prostate et du poumon et le variant rs12144215 associé aux cancers colorectal, du sein et de la prostate (Karami et al., 2016). Une étude a également détecté une région de cassure chromosomique localisée dans l'exon 3 d'*Apollo* corrélée à une tumeur de Wilms, une forme de cancer du rein pédiatrique (Natrajan et al., 2007). Le variant rs11552449 (c.181C>T, p.His61Tyr) associé à des cancers du sein est jusqu'à présent le seul à avoir fait l'objet d'études fonctionnelles. La première étude du gène *Apollo* humain réalisée par l'équipe de Patrick Concannon et Ilja Demuth a montré qu'il existait au moins deux transcrits alternatifs *Apollo*, l'un contenant l'ensemble des quatre exons et l'autre dépourvu de l'exon 2 (Demuth et al., 2004). Dans ce contexte, il a été montré que le variant rs11552449 (c.181C>T, p.His61Tyr) induisait une augmentation de la quantité de transcrits *Apollo* contenant l'exon 2 dans les cellules lymphoblastoïdes LLB/LCL (Lymphoblastoid Cell Line) de patients hétérozygotes. D'autre part, les cellules LLB de patients hétérozygotes pour le variant rs11552449 d'*Apollo* présentent une augmentation de la sensibilité à la MMC (ICLs) et aux IR (DSBs) par rapport aux LLB homozygotes (Herwest et al., 2018). En revanche, l'étude *in vitro* de l'activité de la forme variante *Apollo*^{H61Y} montre que le variant rs11552449 n'impacte pas l'activité exonucléase de la protéine (Baddock et al., 2021).

Projet de thèse

Notre équipe se consacre depuis plusieurs années à la recherche de nouveaux gènes de prédisposition au carcinome cellulaire rénal (Renal Cell Carcinoma, RCC) et à l'étude des mécanismes à l'origine du développement de RCC. Dans cet objectif, une partie des projets de recherche sont élaborés à partir de données génétiques collectées chez des familles de patients atteints de RCC héréditaires. Cette stratégie se justifie par le fait que les gènes de prédisposition au RCC sont plus généralement impliqués dans les voies biologiques majeures de l'oncogenèse rénale, y compris pour les cas sporadiques. Ainsi, la caractérisation fonctionnelle des gènes potentiellement associés au développement de RCC héréditaires constitue un axe de recherche essentiel à la meilleure compréhension des mécanismes initiateurs de l'oncogenèse.

La dérégulation des voies de réponse aux dommages de l'ADN (DNA Damage Response, DDR) n'est pas classiquement décrite comme un mécanisme important de l'oncogenèse rénale. Les gènes associés à cette voie sont donc peu étudiés dans le contexte des RCC. Cependant, certaines études contredisent ce paradigme. En effet, plusieurs gènes fréquemment mutés dans les RCC comme *VHL*, *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1* exercent des fonctions directement liées à la DDR. D'autre part, des études de séquençage récentes ont permis de mettre en évidence la présence de variants potentiellement pathogéniques dans des gènes majeurs de la DDR chez une partie des patients atteints de RCC.

Le gène *DCLRE1B/Apollo* code la protéine SNM1B/Apollo impliquée dans la DDR et la protection des télomères. De manière intéressante, notre équipe a identifié deux variants hétérozygotes constitutifs dans le gène *Apollo* chez des patients atteints de RCC héréditaires : le variant c.737A>T, p.Asn246Ile dans une première famille (noté N246I) et le variant c.817T>C, p.Tyr273His dans une seconde famille (noté Y273H). Aucun de ces patients ne présentait de mutations dans les gènes connus de prédisposition au RCC. Mon projet de thèse consistait ainsi à étudier la possibilité qu'*Apollo* soit un gène impliqué dans l'oncogenèse rénale.

Les activités d'*Apollo* n'ayant jamais été étudiées dans les cellules rénales, le premier objectif de ma thèse était d'étudier ses activités associées à la DDR et au maintien des télomères dans

la lignée cellulaire rénale épithéliale humaine HKC8. Dans ce modèle, j'ai cherché à caractériser l'impact de l'expression d'*Apollo* sur i) les processus de mort et survie cellulaires en réponse aux dommages de l'ADN et ii) sur la protection de l'intégrité des télomères. A partir de cette étude des activités d'*Apollo* dans les cellules HKC8, mon second objectif consistait à déterminer les potentiels impacts fonctionnels des variants N246I et Y273H sur ces activités. Finalement, le dernier objectif consistait à identifier les mécanismes moléculaires associés aux activités d'*Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} et à rechercher l'existence de liens entre ces mécanismes et l'oncogenèse rénale.

Résultats

I Etude de la réponse aux ICLs et DSBs dans la lignée rénale HKC8

La lignée HKC8 est issue d'un épithélium rénal non-tumoral et a été immortalisée par transformation avec un virus hybride adénovirus 12/SV40 (Simian Virus 40) (Racusen et al., 1997). Une première partie de ce projet de thèse consistait à caractériser la réponse de la lignée HKC8 au stress génotoxique induit par les ICLs et DSBs, les deux types de dommages plus particulièrement étudiés au cours de ma thèse, de façon à pouvoir ensuite étudier l'activité d'Apollo dans la réponse à ce type de stress dans cette lignée.

Dans un premier temps, nous avons étudié le niveau d'activation de la DDR dans les cellules HKC8 en réponse aux agents génotoxiques inducteurs d'ICLs ou de DSBs. Pour cela, les cellules HKC8 ont été traitées avec l'étoposide (un inhibiteur de la topoisomérase II, inducteur de DSBs), le cisplatine ou la MMC (inducteurs d'ICLs) pendant 16h. Ces cellules ont ensuite été fixées puis marquées avec un anticorps spécifique de γ H2AX afin de quantifier le nombre de foci de signalisation des dommages de l'ADN par immunofluorescence.

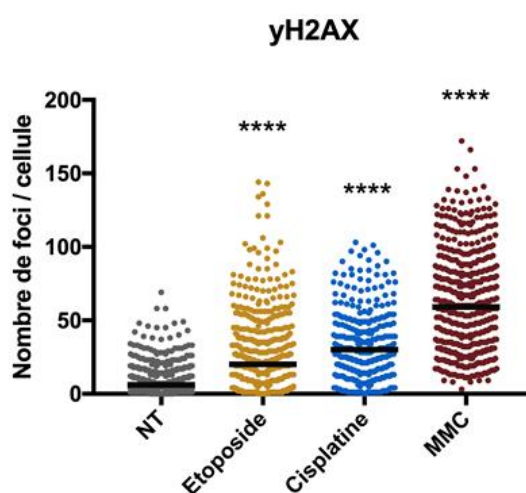


Figure 21 : Etude par immunofluorescence des foci γ H2AX dans les cellules HKC8 suite à des traitements génotoxiques.

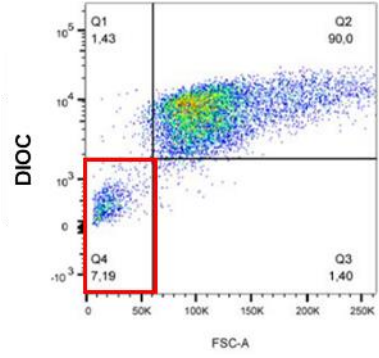
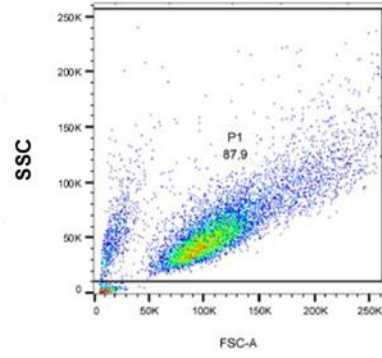
Quantification du nombre de foci γ H2AX par cellule dans les cellules HKC8 non traitées ou traitées avec l'étoposide (25 μ g/mL), le cisplatine (25 μ M) ou la MMC (1 μ g/mL) pendant 16h. Les médianes et écarts interquartiles de $n \geq 300$ cellules sont représentés. Les valeurs statistiques découlent d'une analyse ANOVA univariée par rapport aux cellules non traitées (NT) avec $\alpha=0,05$. **** : $p < 0,0001$.

L'analyse des résultats montre une augmentation significative du nombre de foci γ H2AX par cellule dans les cellules HKC8 traitées avec les différents agents génotoxiques par rapport aux cellules non traitées (NT) (**Figure 21**). Ainsi, l'addition des différentes drogues induit une augmentation du nombre de dommages de l'ADN dans les cellules HKC8.

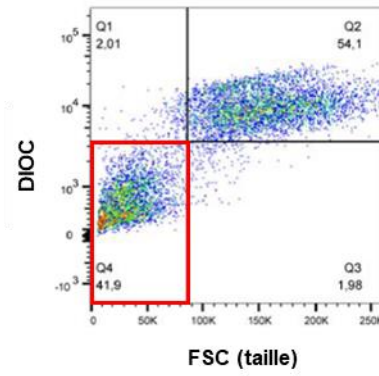
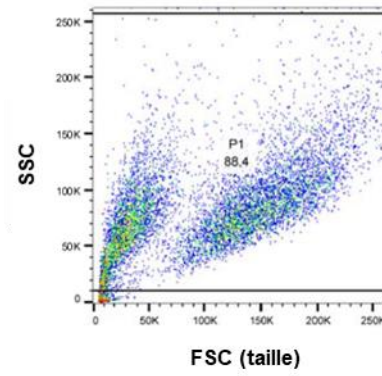
Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'impact des drogues inductrices d'ICLs ou de DSBs sur la viabilité des cellules HKC8. Comme détaillé dans l'introduction, la mort cellulaire par apoptose est une voie classiquement induite par l'activation de p53 en présence d'un stress génotoxique. Nous avons donc commencé par étudier le niveau d'apoptose des cellules HKC8 en réponse à l'étoposide, au cisplatine ou à la MMC par cytométrie en flux. Pour ce faire, les cellules HKC8 ont été traitées avec ces différentes drogues pendant 18h. L'ensemble des cellules (attachées et en suspension) ont ensuite été marquées au 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine Iodide (DiOC₆(3) noté DIOC), un composé s'accumulant dans les mitochondries possédant un potentiel mitochondrial. Finalement, les cellules apoptotiques ont été quantifiées par cytométrie en flux à partir d'une sélection multiparamétrique. Tout d'abord, une première population cellulaire d'intérêt (>5000 à 10000 cellules/analyse) est définie en excluant les débris cellulaires (**Figure 22A**). A partir de cette population, les cellules apoptotiques sont définies en fonction de la taille et du marquage au DIOC. En effet, un faible marquage du DIOC permet d'identifier les cellules avec un faible potentiel mitochondrial, une caractéristique associée à l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. De plus, les cellules apoptotiques sont caractérisées par une diminution de leur taille. Ainsi, les cellules apoptotiques sont caractérisées comme les cellules de petite taille (taille-) et faiblement marquées au DIOC (DIOC-). Dans ces conditions, les résultats montrent que les traitements à l'étoposide, au cisplatine et à la MMC induisent une augmentation du pourcentage de cellules HKC8 apoptotiques (**Figure 22B**). Plus spécifiquement, ces traitements induisent l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose dans les cellules HKC8. Au cours de ces expériences, nous avons également réalisé un marquage des cellules à l'iodure de propidium (IP), un composé non perméant permettant d'identifier les cellules nécrotiques. Nous avons ainsi observé que les traitements à l'étoposide, au cisplatine ou à la MMC induisent pas ou peu de nécrose primaire dans les cellules HKC8 (résultats non présentés).

A

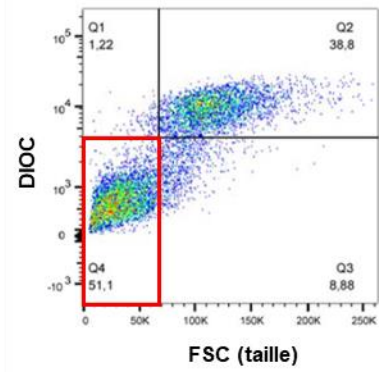
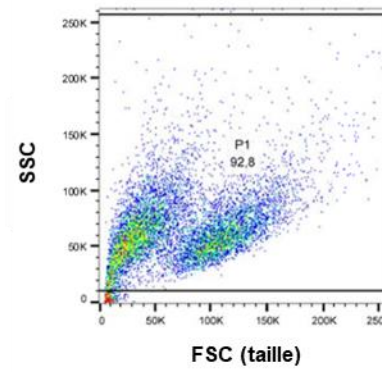
NT



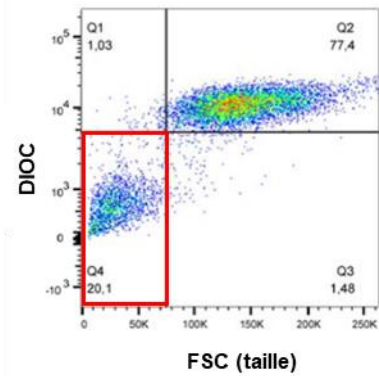
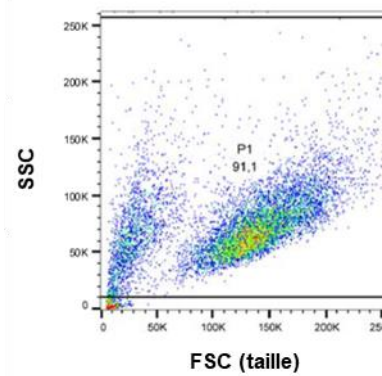
Etoposide



Cisplatine



MMC



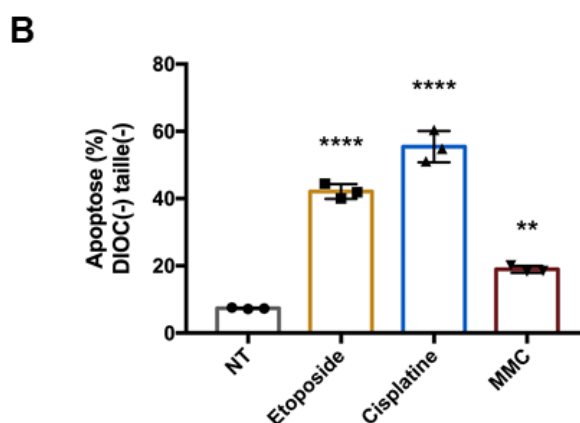


Figure 22 : Analyse du niveau d'apoptose des cellules HKC8 par cytométrie en flux.

A Cytogrammes représentatifs des étapes d'analyse des populations cellulaires pour la quantification des cellules HKC8 apoptotiques non traitées ou traitées avec l'étoposide (25µg/mL), le cisplatine (25µM) ou la MMC (1µg/mL) pendant 18h. L'analyse SSC (rugosité) / FSC (taille) permet d'exclure les débris et de sélectionner la population initiale P1 (10000 cellules P1/analyse). Ensuite, la population P1 est divisée en quatre sous-populations (Q1, Q2, Q3, Q4) en fonction de la taille et de l'intensité du marquage au DIOC. La sous-population Q4 encadrée en rouge correspond aux cellules définies comme apoptotiques (DIOC- taille-). **B** Pourcentage de cellules HKC8 apoptotiques non traitées ou traitées avec l'étoposide (25µg/mL), le cisplatine (25µM) ou la MMC (1µg/mL) pendant 18h. Les moyennes et écart-types de triplicats biologiques sont représentés. Les valeurs statistiques découlent d'une analyse ANOVA univariée par rapport aux cellules non traitées (NT) avec $\alpha=0,05$. **: $p<0,01$, ****: $p<0,0001$.

En parallèle de la quantification de l'apoptose par cytométrie en flux, les niveaux de marqueurs protéiques associés à la DDR ou à l'apoptose dépendante de p53 ont été analysés par Western blot. De manière cohérente avec l'augmentation du nombre de foci γ H2AX observés par immunofluorescence, le niveau de phosphorylation de H2AX détecté par Western blot augmente en réponse aux traitements avec l'étoposide, le cisplatine ou la MMC dans les cellules HKC8 (**Figure 23**). Ce résultat confirme donc l'activation de la DDR en réponse aux agents génotoxiques inducteurs d'ICLs et de DSBs dans cette lignée cellulaire. Les résultats montrent également que l'exposition des cellules HKC8 à l'étoposide, au cisplatine ou à la MMC induit une augmentation du niveau de phosphorylation de p53 sur son résidu sérine S15 (p-p53), un marqueur de son activation, et du clivage de la caspase 3 (**Figure 23**). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'apoptose induite dans les cellules HKC8 en réponse aux traitements génotoxiques inducteurs d'ICLs ou de DSBs est dépendante de la signalisation de p53 et des

caspace. Dans certains Western Blot, nous notons également la présence d'une seconde bande à environ 40kDa révélée avec l'anticorps spécifique de la forme phosphorylée de p53. Cette bande pourrait correspondre à une isoforme alternative de p53 ou résulter d'un clivage de p53.

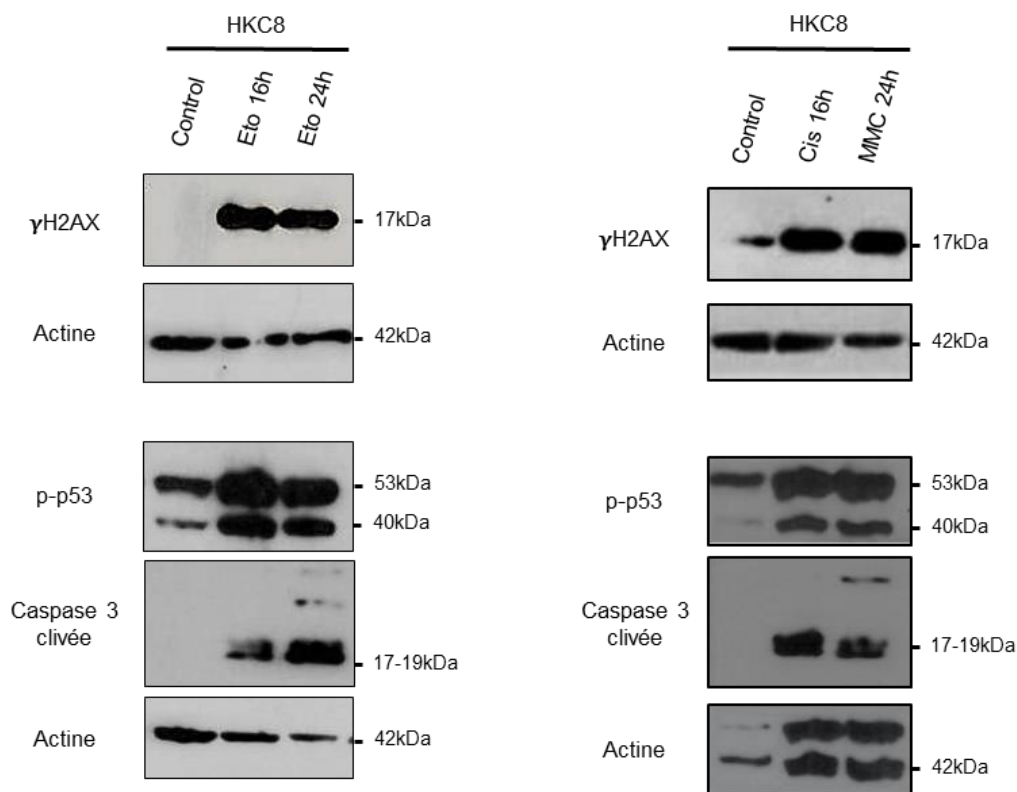


Figure 23 : Analyse de marqueurs protéiques associés à la DDR ou à l'apoptose dépendante de p53 dans les cellules HKC8 par Western Blot.

Analyse par Western blot des extraits protéiques de cellules HKC8 non traitées ou traitées avec l'étoposide (25µg/mL), le cisplatine (25µM) ou la MMC (1µg/mL) pendant 16h et/ou 24h.

II Etude du rôle d'Apollo dans la réponse aux ICLs et DSBs dans la lignée rénale HKC8

Suite à la caractérisation de la réponse des cellules HKC8 aux ICLs et DSBs, nous avons initié l'étude de l'activité d'Apollo dans la modulation de cette réponse. En effet, *Apollo* est un gène impliqué dans la DDR induite par les ICLs et DSBs dans divers modèles cellulaires (revue de (Schmiester & Demuth, 2017)). Cependant, aucune recherche ne s'était jusqu'à présent focalisée sur l'étude des activités d'Apollo dans la DDR dans un modèle de cellules rénales épithéliales. Dans cet objectif, différents systèmes ont été utilisés pour diminuer ou supprimer l'expression d'Apollo dans les cellules HKC8. Une partie de cette étude a ainsi été réalisée dans des cellules HKC8 préalablement traitées avec des ARN interférents spécifiques des ARNm *Apollo* (siARN *Apollo*), permettant de diminuer la quantité de transcrits. En parallèle, différentes séries d'édition du gène *Apollo* par CRISPR Cas9 ont été réalisées afin d'obtenir des clones HKC8 *Apollo*^{-/-} sans aucune expression du gène.

Concernant la caractérisation de ces modèles, nous avons tenté à plusieurs reprises de détecter la protéine Apollo endogène dans les cellules HKC8 par Western Blot. Pour cela, nous avons réalisé différents essais d'immunoprécipitation avec un anticorps anti-Apollo à partir d'extraits protéiques totaux ou de fractions chromatiniennes, sans succès. Cet échec est toutefois cohérent avec ceux précédemment rapportés par différentes équipes dans d'autres modèles cellulaires incluant les cellules HeLa, HEK293T et les fibroblastes BJ (Demuth et al., 2004; Lenain et al., 2006; van Overbeek & de Lange, 2006). En conséquence, aucun Western blot de la protéine Apollo endogène n'est présenté dans la suite des résultats.

1 - Impact de la diminution de l'expression d'Apollo (siARN Apollo)

L'exposition des cellules HKC8 aux agents inducteurs d'ICLs (cisplatine, MMC) et DSBs (étoposide) induit l'apoptose (**Figure 22**). Dans un premier temps, nous avons donc étudié l'impact de la diminution de l'expression d'Apollo sur l'induction de l'apoptose dans les cellules HKC8. Pour cela, les cellules préalablement traitées avec des siARN *Apollo* ont été exposées à l'étoposide, au cisplatine ou à la MMC pendant des durées comprises entre 16h et 24h puis marquées avec du DIOC avant d'être analysées par cytométrie en flux. Afin de contrôler la

spécificité des effets observés, les cellules HKC8 ont en parallèle été traitées avec des siARN contrôles, non spécifiques d'*Apollo* (siARN contrôle). De plus, l'efficacité des siARN *Apollo* a été vérifiée en quantifiant le niveau des ARNm *Apollo* dans les cellules par RT-qPCR (**Article Figure 2A**).

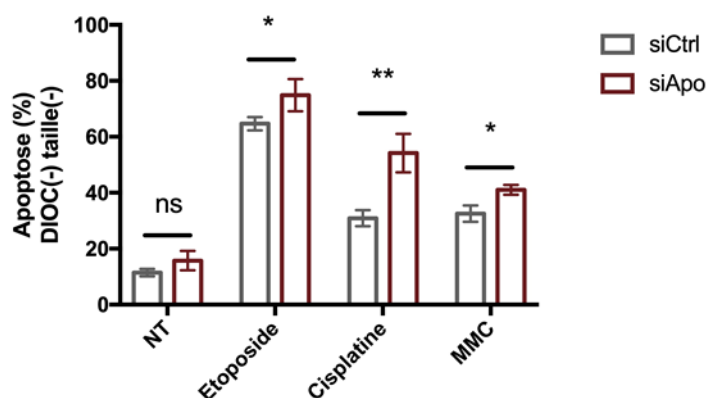


Figure 24 : La diminution de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 induit une augmentation de l'apoptose en réponse aux ICLs et aux DSBs.

Analyse par cytométrie en flux de l'apoptose induite dans les cellules HKC8 transfectées avec des siARN *Apollo* (siApo) ou des siARN contrôle (siCtrl) en absence de traitement et après un traitement à l'étoposide (25µg/mL), au cisplatine (25µM) ou à la MMC (1µg/mL) pendant 16-24h. Les moyennes et écart-types de triplicats biologiques sont représentés. Résultats représentatifs de trois expériences indépendantes. Les valeurs statistiques découlent d'un test de Student bilatéral par rapport aux cellules transfectées avec les siCtrl avec $\alpha=0,05$. ns : non significatif, * : $p<0,05$, ** : $p<0,01$.

L'analyse de l'apoptose par cytométrie en flux montre que la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 induit une augmentation significative du pourcentage de cellules apoptotiques en réponse aux différentes drogues génotoxiques par rapport aux cellules traitées avec les siCtrl (**Figure 24**). Cependant, l'effet est plus prononcé suite au traitement avec le cisplatine. Ces résultats suggèrent que la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit une augmentation de la sensibilité des cellules HKC8 aux ICLs et aux DSBs. Il est intéressant de noter que ces résultats sont en accord avec notre étude de sensibilité à plus long terme des cellules HKC8 traitées avec des siARN *Apollo* en réponse aux inducteurs d'ICLs (cisplatine, MMC) (**Article Figures 2C, 2D**). En revanche, l'effet observé par cytométrie en flux en présence d'étoposide n'a pas été retrouvé dans l'étude de la sensibilité à plus long terme. Cette différence peut avoir plusieurs explications. Tout d'abord, notre étude de la sensibilité à

long terme a été réalisée par suivi de la confluence cellulaire dans un automate Incucyte et reflète donc à la fois la survie et la prolifération cellulaire. De plus, les doses d'étoposide utilisées dans ces différentes études sont différentes. En effet, la concentration d'étoposide dans les expériences de cytométrie en flux est de 25µg/mL contre 100-400ng/mL dans les expériences avec l'Incucyte. Finalement, il est possible que la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* ait un effet différent sur les sensibilités à court terme et à long terme.

2 - Impact de la suppression de l'expression d'*Apollo* (HKC8 *Apollo*^{-/-})

Pour compléter cette étude, différents clones HKC8 édités par CRISPR Cas 9 ont été générés afin d'obtenir un modèle de cellules rénales épithéliales humaines *Apollo*^{-/-} afin d'étudier l'effet de la suppression de l'expression d'*Apollo* sur l'induction de l'apoptose. Afin de maximiser nos chances d'obtenir des clones HKC8 *Apollo*^{-/-}, nous avons réalisé quatre séries d'édition par CRISPR Cas 9 en utilisant quatre ARN guides (gARN) différents, chacun spécifique d'un exon d'*Apollo*. A l'issue de ces éditions par CRISPR Cas 9, nous avons obtenu une cinquantaine de clones répartis entre les quatre séries d'édition. La protéine *Apollo* endogène étant indétectable en Western blot, nous avons quantifié le niveau d'ARNm d'*Apollo* par RT-qPCR dans l'objectif d'identifier de potentiels clones avec un niveau réduit ou nul de transcrits. Les clones les plus prometteurs ont ensuite été séquencés afin d'identifier la ou les modification(s) génétique(s) d'*Apollo* associée(s) à leur profil transcriptionnel. Suite à ce premier crible, nous avons initialement sélectionné quatre clones d'intérêt : deux clones obtenus par édition de l'exon 1 (HKC8 #1 et HKC8 #2), un clone obtenu par édition de l'exon 2 (HKC8 #3) et un clone obtenu par édition de l'exon 4 (HKC8 #4) (**Figure 25A**).

Le clone #1 est caractérisé par l'absence d'ARNm d'*Apollo* et correspond au clone présenté dans les résultats de l'article soumis (**Figure 25B**). Ce clone présente une modification génétique de l'exon 1 complexe et imparfaitement définie mais entraînant la perte d'une partie importante de cet exon, permettant d'expliquer l'absence de transcrits (**Tableau 1**). Le clone #1 constitue ainsi l'unique clone HKC8 avec une absence d'expression d'*Apollo* parmi la cinquantaine de clones obtenus par édition par CRISPR Cas 9. Par ailleurs, malgré le manque de clarté sur la séquence de l'exon 1 de ce clone, l'analyse du pourcentage des dommages télomériques indique une augmentation de ce pourcentage cohérente avec le rôle d'*Apollo*

dans le maintien des télomères et compensée par la réexpression de la forme *Apollo*^{WT} exogène (**Article Figure 5B**). Ainsi, la caractérisation fonctionnelle du clone #1 confirme son statut *Apollo*^{-/-}.

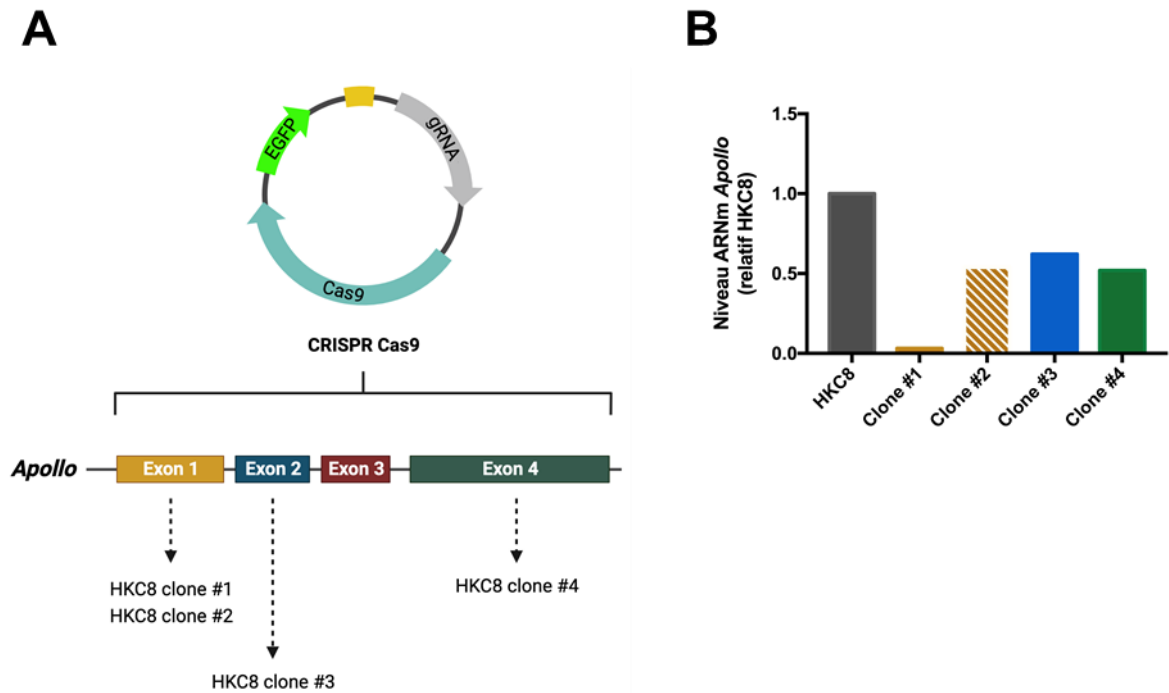


Figure 25 : Analyse de la quantité d'ARNm *Apollo* dans les clones HKC8 sélectionnés à l'issue de l'édition par CRISPR Cas 9.

A Représentation schématique du gène *Apollo* et des exons ciblés par CRISPR Cas 9 dans les différents clones HKC8. **B** Quantification relative des ARNm *Apollo* dans les cellules HKC8 parentales et dans les différents clones sélectionnés suite à l'édition par CRISPR Cas 9. Les gènes de ménage utilisés sont *PPIA* et *HPRT1*.

Localisation gARN	Clone	Insertion/délétion	Séquence ADN
	WT	-	5'_TTTTATCGGGACGCCGTTGTGGAAGCCTCACGCAGGAGCCCTGCCCCGTGGAGAAGATCCCACTGGT GACTCCAACCTACCACCATGAATGGGGTCTGATCCCC ATACGCCATCGCAGTGGACTT _3'
Exon 1	#1	?	5'_TTTTATCAGGACCCCATTCATGGTG_3'
	#2	Del 7pb	5'_TTTTATCGGGACGCCGTTGTGGAAGCCTCACGCAGGAGCCCTGCCCCGTGGAGAAGATCCCACTGGT GACTCCAACCTACCACCATGAATGGGGTCTGATC----- CGCCCATCGCAGTGGACTT _3'
Exon 2	WT	-	5'_TGGACAAGAGACCAT GACCGTAACCCCTCTCGATGCC _3'
	#3	Del 4pb	5'_TGGACAAGAGACCAT G ---- AACCCCTCTCGATGCC _3'
Exon 4	WT	-	5'_GGAACCAAGACCCACC CTACGATTGCTATCCTT CCCAAGCCG_3'
	#4	Del 2pb	5'_GGAACCAAGACCCACC-- ACGATTGCTATCCTT CCCAAGCCG_3'

Tableau 1 : Analyse des séquences ADN du gène *Apollo* dans les clones HKC8 obtenus à l'issue de l'édition par CRISPR Cas 9.

La séquence ADN de la lignée parentale HKC8 est alignée avec celle des clones pour chaque exon. Les séquences en gras correspondent aux séquences ciblées par le gARN pour chaque exon. La séquence soulignée pour le clone #4 diffère de la séquence de référence mais est d'origine indéterminée.

Les clones HKC8 #2, #3 et #4 présentent quant à eux un niveau d'ARNm *Apollo* réduit d'environ 50% par rapport aux cellules HKC8 parentales. Au niveau génomique, chacun de ces clones présente une délétion au sein de la séquence du gène *Apollo* entraînant un décalage du cadre de lecture. Le clone #2 présente ainsi une délétion homozygote de 7 pb dans la séquence codant l'exon 1 aboutissant théoriquement à la production d'une protéine tronquée contenant les 6 premiers acides aminés d'*Apollo*. Le clone #3 présente une délétion homozygote de 4 pb dans la séquence codant l'exon 2 aboutissant théoriquement à la production d'une protéine tronquée contenant les 90 premiers acides aminés d'*Apollo*. Finalement, le clone #4 présente une délétion homozygote de 2pb dans la séquence codant l'exon 4 aboutissant théoriquement à la production d'une protéine tronquée contenant les 249 premiers acides aminés d'*Apollo*. Malgré l'absence de validation du statut *Apollo*^{-/-} au niveau transcriptionnel et protéique, nous avons initialement intégré ces clones à l'étude fonctionnelle d'*Apollo* dans l'objectif de comparer leur phénotype à celui du clone #1.

L'étude de l'induction de l'apoptose dans les clones #1, #2, #3 et #4 a été réalisée de la même façon que précédemment. Brièvement, les cellules ont été traitées avec le cisplatine ou

l'étoposide pendant des durées comprises entre 16h et 20h puis marquées avec du DIOC et analysées par cytométrie en flux.

L'analyse des résultats montre différents profils de réponse en fonction des clones. Tout d'abord, le clone #1 présente une diminution du pourcentage de cellules apoptotiques par rapport aux cellules HKC8 en réponse à l'étoposide et au cisplatine (**Figure 26**). Cette diminution a également pu être observée avec le clone #2 (résultat non présenté). Ces résultats suggèrent que la perte d'expression d'*Apollo* induit une augmentation de la résistance des cellules HKC8 aux traitements génotoxique inducteurs de DSBs et ICLs. Cependant, les résultats diffèrent avec les clones #3 et #4. En effet, ces deux clones présentent des pourcentages de cellules apoptotiques similaires aux cellules HKC8 en réponse à l'étoposide. Concernant le cisplatine, deux réponses différentes sont observées : le clone #3 présente une forte augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques tandis que le clone #4 présente un pourcentage similaire à celui des cellules HKC8. Comme décrit précédemment, les clones #3 et #4 sont caractérisés par des délétions dans la séquence ADN d'*Apollo* pouvant théoriquement aboutir à la production de versions tronquées de la protéine. Il est donc possible que les différences de réponse avec le clone #1 (et #2) soient expliquées par l'inhibition incomplète de l'expression d'*Apollo* dans les clones #3 et #4. L'étude de cette hypothèse est limitée par le fait que la protéine *Apollo* endogène reste indétectable en Western blot. En conséquence, il est actuellement impossible de déterminer les caractéristiques des versions tronquées de la protéine *Apollo* probablement produites dans les clones #3 et #4.

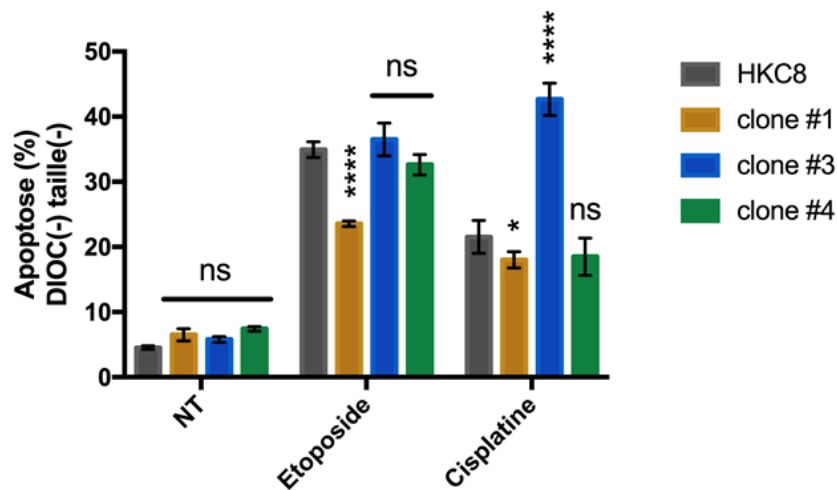


Figure 26 : Analyse de l'induction de l'apoptose en réponse aux DSBs et ICLs dans les clones HKC8 présentant une altération de la séquence ADN d'Apollo.

Analyse par cytométrie en flux de l'apoptose induite dans les cellules HKC8 parentales et les clones issus de l'édition génétique d'Apollo par CRISPR Cas 9 en absence de traitement et après un traitement à l'étoposide (25µg/mL) ou au cisplatine (25µM) pendant 16-20h. Les moyennes et écart-types de triplicats biologiques sont représentés. Les valeurs statistiques découlent d'une analyse ANOVA bivariable par rapport aux cellules HKC8 avec $\alpha=0,05$. ns : non significatif, * : $p<0,05$, **** : $p<0,0001$.

Pour conclure sur cette partie, nous avons initialement sélectionné quatre clones d'intérêt, susceptibles de constituer des lignées HKC8 *Apollo*^{-/-}. L'étude de l'induction de l'apoptose en réponse à des traitements génotoxiques inducteurs de DSBs ou ICLs nous a montré que ces clones présentaient des profils de réponse variable. Il est probable que cette variation résulte de la différence d'impact des altérations génétiques de chacun des clones sur l'expression d'Apollo. En particulier, un codon stop localisé dans l'exon 2 (clone #3) ou l'exon 4 (clone #4) permet théoriquement la production d'une protéine tronquée. Ainsi, en raison des incertitudes demeurant au sujet du statut de l'expression d'Apollo dans les différentes lignées clonales, nous avons choisi de conserver uniquement le clone #1 pour la suite des analyses fonctionnelles. Ce clone correspond à la lignée HKC8 *Apollo*^{-/-} utilisée dans l'article soumis.

III Article : Caractérisation des activités des formes sauvage et mutées du gène *Apollo* dans la lignée cellulaire rénale HKC8

1 - Résumé de l'article

Les deux familles à l'origine de notre étude incluent plusieurs membres atteints de ccRCC sans mutations dans les gènes de prédisposition connus. Nous avons donc réalisé un séquençage d'exome de certains membres de ces familles afin d'identifier de potentiels nouveaux gènes de prédisposition au ccRCC. Nous avons ainsi identifié deux variants hétérozygotes constitutifs dans le gène *DCLRE1B/Apollo* : le variant c.737A>T, p.Asn246Ile dans la famille A (noté N246I) et le variant c.817T>C, p.Tyr273His dans la famille B (noté Y273H) (**Article Figure 1A**). Le gène *DCLRE1B/Apollo* code la protéine SNM1B/Apollo impliquée dans la DDR et la protection des télomères. Les variants N246I et Y273H sont détectés dans le sang des patients et les échantillons de tumeurs disponibles (**Article Figure 1B**). Nous avons généré des lignées lymphoblastoïdes issues du sang de certains patients. Le séquençage des ADN rétro-transcrits à partir des ARNm de ces lignées montre la présence des ARNm sauvage et porteurs des variants (**Article Figure 1E**). Ainsi, les séquences des variants peuvent être transcrites. D'autre part, ces variations sont localisées dans le domaine métallo- β -lactamase (MBL) codant l'activité nucléase de la protéine Apollo et sont prédits comme délétères ou probablement délétères par différents outils de prédiction *in silico* tels que PolyPhen et ClinPred (**Article Figure 1C, 1D**). Nous avons donc formulé l'hypothèse que les variants N246I et Y273H d'*Apollo* constituent des mutations altérant la fonction de la protéine et favorisant le processus d'oncogenèse rénale.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'activité d'*Apollo* dans la réponse aux dommages de l'ADN dans la lignée cellulaire HKC8 issue de l'épithélium tubulaire rénal humain non-tumoral. Malgré l'impossibilité de détecter la protéine Apollo endogène par Western blot, nous avons montré que le niveau des ARNm *Apollo* augmente en réponse au cisplatine, un inducteur d'ICLs, mais pas en réponse à l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II et inducteur de DSBs, dans la lignée HKC8 (**Article Figure 2A**). En parallèle, la diminution de l'expression

d'*Apollo* par l'addition de siARN spécifiques d'*Apollo* ou la suppression de cette expression par la technique de CRISPR Cas 9 induit une augmentation de la sensibilité des cellules HKC8 au cisplatine (**Article Figures 2C, 3E**) et à la MMC (**Article Figures 2D, 3F**), un autre agent inducteur d'ICLs, mais pas à l'étoposide (**Article Figures 2E, 3G**). Finalement, la suppression de l'expression d'*Apollo* induit une diminution de la prolifération cellulaire associée à une augmentation du nombre de foci marqueurs des DSBs (53BP1 et γ H2AX), indiquant la génération et/ou la persistance de cassures de l'ADN en réponse à l'absence d'*Apollo* (**Article Figures 3C, 3D**). Ces résultats suggèrent qu'*Apollo* joue un rôle important dans la réponse aux dommages de l'ADN en absence de stress génotoxique et suite à l'induction d'ICLs dans la lignée rénale humaine HKC8. A l'inverse, *Apollo* ne semble pas jouer de rôle dans la réponse aux DSBs induits par un inhibiteur de la topoisomérase II. Cette étude devra être poursuivie afin d'élucider les mécanismes par lesquels *Apollo* est impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN et déterminer l'impact des mutants d'*Apollo* sur ses activités suite à ces dommages.

Nous avons également étudié le rôle d'*Apollo* sauvage (*Apollo*^{WT}) ainsi que le potentiel impact des mutants (*Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H}) dans la protection des télomères dans les cellules HKC8. Dans cette lignée, nous avons retrouvé l'interaction décrite dans la littérature entre *Apollo*^{WT} et TRF2 (**Article Figures 4A, 4B**). Nous avons également montré que les mutants *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} conservent cette interaction et que les mutations ne semblent pas modifier cette interaction (**Article Figures 4B, 4C**). Ces résultats suggèrent que, dans un contexte hétérozygote, les mutants *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} ont la capacité de remplacer *Apollo*^{WT} dans une partie des complexes *Apollo*-TRF2. Afin d'étudier le potentiel impact fonctionnel de la présence de complexes *Apollo*^{N246I}-TRF2 ou *Apollo*^{Y273H}-TRF2, nous avons analysé le pourcentage de dommages télomériques dans les lignées HKC8 et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées avec les différentes formes d'*Apollo*. Dans ce modèle, la suppression de l'expression d'*Apollo* induit une augmentation significative du pourcentage de dommages télomériques (**Article Figure 5**). De plus, tandis que la lignée HKC8 *Apollo*^{-/-} + *Apollo*^{WT} restaure un niveau de dommages faible, similaire à celui de la lignée HKC8 parentale, les lignées HKC8 *Apollo*^{-/-} + *Apollo*^{N246I} et HKC8 *Apollo*^{-/-} + *Apollo*^{Y273H} présentent le même pourcentage de dommages télomériques que la lignée HKC8 *Apollo*^{-/-}. Ainsi, la suppression de l'expression d'*Apollo* dans

la lignée rénale HKC8 induit un défaut de protection des télomères et l'expression des mutants *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} échoue à restaurer cette protection, contrairement à *Apollo*^{WT}.

En conclusion, les mutants *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} identifiés chez des patients atteints de ccRCC induisent un défaut de protection des télomères dans les cellules rénales humaines HKC8, suggérant que ces mutants pourraient participer à l'émergence d'une instabilité chromosomique favorable à l'oncogenèse rénale. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude afin de mieux caractériser le rôle d'un défaut d'*Apollo* comme possible initiateur et/ou activateur de l'oncogenèse rénale et déterminer si *Apollo* constitue nouveau gène de prédisposition au ccRCC.

L'ensemble de ces résultats a permis la rédaction de l'article présenté ci-après. Cet article est actuellement « under review » dans le journal *Biochimica et Biophysica Acta : Molecular Basis of Disease*.

« *DCLRE1B/Apollo* germline mutations associated with renal cell carcinoma impair telomere protection » [Charlie Bories](#), Thomas Lejour, Florine Adolphe, Laëtitia Kermasson, Sophie Couvé, Laura Tanguy, Gabriela Luszczewska, Manon Watzky, Pauline Garnier, Regina Groisman, Sophie Ferlicot, Stéphane Richard, Murat Saparbaev, Patrick Revy, Sophie Gad and Flore Renaud

2 - Article soumis

"DCLRE1B/Apollo germline mutations associated with renal cell carcinoma impair telomere protection"

Charlie Bories^{1,2}, Thomas Lejour^{1,2}, Florine Adolphe^{1,2}, Laëtitia Kermasson³, Sophie Couvé^{1,2}, Laura Tanguy^{1,2}, Gabriela Luszczewska^{1,2}, Manon Watzky^{1,2}, Pauline Garnier^{1,2}, Regina Groisman², Sophie Ferlicot^{2,4}, Stéphane Richard^{1,2,5}, Murat Saparbaev², Patrick Revy³, Sophie Gad^{1,2} and Flore Renaud^{1,2, *}

1. EPHE, PSL Université, Paris, France ;
2. CNRS UMR 9019, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, UMR 9019 CNRS, 114 rue Edouard Vaillant, Villejuif 94800, France;
3. Laboratory of Genome Dynamics in the Immune System, Laboratoire labellisé Ligue Nationale contre le Cancer, INSERM UMR 1163, Université de Paris, Imagine Institute, Paris, France;
4. Département de Pathologie, AP-HP, Université Paris-Saclay, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France ;
5. Réseau National de Référence pour Cancers Rares de l'Adulte PREDIR labellisé par l'INCa, Hôpital de Bicêtre, AP-HP, et Service d'Urologie, Le Kremlin-Bicêtre, France.

*: **corresponding author:** flore.renaud-paitra@gustaveroussy.fr

Abstract

Hereditary renal cell carcinoma (RCC) is caused by germline mutations in a subset of genes, including *VHL*, *MET*, *FLCN* and *FH*. However, many familial RCC cases do not harbor mutations in the known predisposition genes. Using Whole Exome Sequencing, we identified two germline missense variants in the *DCLRE1B/Apollo* gene (*Apollo*^{N246I} and *Apollo*^{Y273H}) in two unrelated families with several RCC cases. *Apollo* encodes an exonuclease known to be involved in DNA Damage Response and Repair (DDRR) and telomeres integrity. We characterized these two functions in the human renal epithelial cell line HKC8. The decrease or inhibition of *Apollo* expression sensitizes these cells to DNA interstrand crosslink damage (ICLs). HKC8 *Apollo*^{-/-} cells appear to be defective in the DDRR and present an accumulation of telomere damage. Wild-type and mutated *Apollo* forms could interact with TRF2, a shelterin protein involved in telomere protection. However, only *Apollo*^{WT} is able to rescue the telomere damage in HKC8 *Apollo*^{-/-} cells. Our results strongly suggest that *Apollo*^{N246I} and *Apollo*^{Y273H} are loss-of-function mutants that cause impaired telomere integrity and could lead to genomic instability. Altogether, our results suggest that mutations in *Apollo* could induce renal oncogenesis.

Keywords: *DCLRE1B/Apollo*, renal cell carcinoma, germline mutations, telomere, DNA repair

Introduction

Renal Cell Carcinoma (RCC) account for ~300 000 new cases and ~100 000 deaths yearly worldwide [1]. RCC arise from the renal tubular epithelium and include multiple subtypes based on their histology and genetics [1], [2], with clear cell RCC (ccRCC, 75%), papillary RCC (pRCC, 15%) and chromophobe RCC (chRCC, 5%) being the major subtypes. Inherited diseases have been associated with an increased risk of RCC development, including von Hippel-Lindau (VHL), Hereditary Papillary Renal Carcinoma (HPRC), Birt–Hogg–Dubé (BHD) and Hereditary Leiomyomatosis and RCC (HLRCC)-associated RCC. Inherited RCC account

for 3-5% of all RCC cases and remain minor compared to sporadic cases. However, investigating the mechanisms driving cancer development in inherited RCC led to significant advances in understanding renal oncogenesis in both inherited and sporadic RCC [1], [3]. Indeed, the *VHL* tumor suppressor gene, that notably regulates the hypoxia-inducible factors (HIF), was first identified in VHL patients and subsequently found to be altered in the majority of ccRCC [4], [5]. The identification of *VHL* mutations driving ccRCC tumors was a breakthrough in the ccRCC therapeutic landscape, leading to the emergence of treatments targeting the VHL/HIF signaling pathway in ccRCC patients [6]. Other major sporadic RCC-associated genes [5], [7], [8] including *MET*, *PTEN*, *BAP1*, and *PBRM1* were similarly identified as germline events in familial RCC [9]–[12]. While the predisposing genes remain to be identified in many hereditary RCC cases, the existence of recurrent parallels between sporadic and familial RCC further emphasizes the necessity to search for additional driver genes in such familial cases.

ccRCC is characterized by high genomic instability, including large somatic copy number alterations (SCNA) [5], [13]. Although defective DNA Damage Response and Repair (DDRR) pathways are classically associated with genomic instability, genetic alterations in genes related to DDRR pathways are not usually associated with RCC. However, recent studies provided evidences pointing towards a paradigm shift. In particular, the DDRR-targeted sequencing study by Hartman and colleagues revealed the existence of germline pathogenic variants in DDRR genes in 8.55% of patients with early-onset RCC [14]. DDRR-associated gene variants were also reported in 25% (somatic) and 19% (somatic and germinal) of patients with locally advanced ccRCC and metastatic ccRCC, respectively [15], [16]. Another study reported alterations in the expression of DDR-associated genes in ccRCC, and identified six DDR gene-signatures associated with ccRCC patient prognosis [17]. Finally, defective DDRR pathways in RCC tissues or cell lines could be associated with *VHL* or *PBRM1* defects and an increase in PARP inhibitors sensitivity [18]–[20]. The study of DDRR-associated genes in renal

oncogenesis should be pursued to improve RCC patient prognosis and develop new therapeutic strategies targeting DDR pathways.

The *DCLRE1B* gene (DNA Cross-Link Repair 1B), also known as *SNM1B*, encodes Apollo (name used hereafter for gene and protein). This gene, located at 1p13.2, is composed of 4 exons encoding a 532 amino-acid protein. Apollo is a 5' → 3' exonuclease involved in two fundamental processes related to genome stability: DNA repair and telomere integrity [21]. Indeed, Apollo is involved in the repair of DNA interstrand crosslinks (ICLs) [22]–[25], stalled replication forks [26], and double-strand breaks (DSBs) [23], [24]. In addition, Apollo localizes at and protects telomeres *via* its interaction with TRF2 [24], [27]–[30], a member of the shelterin complex (including TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TPP1, and POT1) in charge of telomere maintenance and integrity [31]. *Apollo* downregulation or deletion leads to the accumulation of dysfunctional telomeres [27], [30], [32]–[34]. Studies in *Apollo*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) revealed that Apollo is involved in the generation, at the leading-end telomeres, of the 3' terminal single-stranded structure, called G-overhang, essential for proper binding of the shelterin complex and formation of the T-loop [32], [33], [35]. In mice, *Apollo* knockout induces perinatal lethality [36]. In humans, an *Apollo* splice variant and germline biallelic mutations were characterized in patients presenting Hoyeraal-Hreidarsson syndrome (HH), one of the most severe form of telomere biology disorders [34], [37], [38]. In addition, *Apollo* single nucleotide polymorphisms (SNPs) were associated with breast cancer and melanoma [39]–[41] while one intronic splice variant was associated with Wilms tumor, a pediatric kidney cancer [42].

In this study, we identified two heterozygous germline missense variants in the *Apollo* gene in two families with inherited ccRCC and no germline mutations in the common RCC-associated genes. We investigated the functional impact on genome integrity of these variants in renal cells. In human renal cell model, we observed an important role for *Apollo* in the response to DNA ICLs and protection of telomeres. Notably, we demonstrated a failure of the *Apollo*

mutants to preserve telomere integrity, suggesting they could cause genomic instability and favor tumorigenesis.

Materials and Methods

Patient samples

The two families gave informed consent for research and blood samples. Family A includes 2 sibling patients, affected by ccRCC at 34 and 55 years old. Family B comprises 3 patients affected by ccRCC at 44, 47 and 62 years old, and one affected by melanoma at 60 years old. One ccRCC fixed tumor was available from each family. Lymphoblastoid cell lines (LLB) were established. DNA was extracted from blood and tumor samples, as previously described [43].

Genetic analyses

We performed Whole Exome Sequencing (WES) on blood samples as previously described [43]. Sanger sequencing was used i) to confirm variants in *DCLRE1B/Apollo* and for tumor analysis, and ii) to verify the sequence of *Apollo* transcripts in LLB. The reference sequence used for annotations is NM_022836.4. For *in silico* analyses, we used different tools included in the free software MobiDetails (Inserm, France).

Apollo expression vectors

The wild-type human *DCLRE1B/Apollo* coding sequence cloned in pBlueScript II Vector (pBSII) was purchased from GeneCust (France). The *Apollo* mutations c.737A>T,p.N246I and c.817T>C,p.Y273H were generated using the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Then, wild-type and mutated *Apollo* sequences were subcloned into pcDNATM3.1/myc-His vector (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA) to express the C-terminal myc-His tagged wild-type or mutant *Apollo* (named *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I}, *Apollo*^{Y273H}).

Cell culture and transfection

The Human Kidney Cell clone 8 (HKC8) is an SV40-Ad12 immortalized cell line from kidney epithelial cells (a kind gift from LC Racusen [44]). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS) and 100µg/mL penicillin-streptomycin (PS) at 37°C and 5% CO₂. LLB were cultivated in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) supplemented with 10% FBS and 100µg/mL PS.

Cells were transfected using FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, WI, USA) at a 3:1 ratio FuGENE®:DNA (µL:µg) according to the manufacturer's protocol.

For transient transfections, cells were collected 48h post-transfection. For stable transfection, 1mg/mL of geneticin was added to the culture medium 48h post-transfection. Cells were then cultured for 2 weeks under constant selection pressure before processing.

CRISPR Cas9 knockout

Guide RNA sequence was cloned into the pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid # 48138, MA, USA). The genomic sequence targeted for CRISPR-Cas9 disruption in the *DCLRE1B/Apollo* gene was 5'-GTCCACTGCGATGGGCGTAT-3'. HKC8 cells were transfected using Lipojet™ transfection reagent (SignaGen Laboratories # SL100468, MD, USA) following the manufacturer's instructions. GFP+ cells were selected 48h post-transfection using a BD FACSAria™ III cell sorter (BD Biosciences, NJ, USA). Single clones were extended and putative *Apollo* knockout cells were identified using RT-qPCR.

siRNA-mediated downregulation

Apollo mRNA was targeted using the ON-TARGETplus Human DCLRE1B siRNA - SMART pool (Dharmacon, L-015780-00-0005, CO, USA). The ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool (Dharmacon, D-001810-10-05) was used as control. Cells seeded in 6-well plates were transfected with 110 pmols siRNA using the Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (ThermoFisher Scientific, MA, USA) according to the manufacturer's protocol.

Reverse transcription and quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from cell pellets using the NucleoSpin RNA Kit (Macherey Nagel, Germany) according to the manufacturer's protocol. mRNA reverse transcription was performed on 1µg of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific) plus RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (ThermoFisher Scientific). cDNA was amplified in the Master Mix Select SYBR® (ThermoFisher Scientific) with the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad, CA, USA). *Peptidylpropyl isomerase (PPIA)* and *hypoxanthine phosphoribosyl (HPRT1)* were used as control genes. Analysis was performed using the CFX Maestro software (BioRad). The sequences of the primers used are:

Apollo_Primer_1_For: 5'-CACCTCTTGCATCGTCACCT-3'

Apollo_Primer_1_Rev: 5'-GGAGGGTTACGGTCATGGTC-3'

Apollo_Primer_2_For: 5'-CCTGGTTCTTCCTTCCCGACAA-3'

Apollo_Primer_2_Rev: 5'-TCCTTTCCAGGCTGTAGAGTC-3'

PPIA_For: 5'-GCCGAGGAAAACCGTGTACT-3'

PPIA_Rev: 5'-CTGCAAACAGCTCAAAGGAGAC-3'

HPRT1_For: 5'-TTGCTTTCCTTGGTCAGGCA-3'

HPRT1_Rev: 5'-ATCCAACACTTCGTGGGGTC-3'

Survival assay

Cells were seeded at 5000 cells/well in 24-well plates and left to attach for 3-4 h before adding increasing doses of genotoxic drugs to the culture medium. Survival was related to cell confluence monitored by the Incucyte® S3 Live-Cell Analysis System (Sartorius, Germany) 5-7 days after treatment.

Immunoprecipitation, Western blotting, and mass spectrometry

Cells were lysed for 15min on ice in Pierce™ IP Lysis Buffer (ThermoFisher Scientific) supplemented with Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (ThermoFisher Scientific). One mg of lysate was incubated with 50µL Anti-c-Myc beads (A7470, Sigma Aldrich, MO, USA) for 2h at 4°C under agitation. Elution was performed by incubating beads with 150ng/µL c-Myc Peptide (M2435, Sigma-Aldrich) for 1h at 4°C under agitation. Immunoprecipitated and input fractions were analyzed by Western blotting with anti-DCLRE1B (A6808, ABclonal, MA, USA) and anti-TRF2 (NB110-57130, Novus Biologicals, Bio-technie, MN, USA) and HRP-coupled anti-rabbit antibody (4010-05, Southern Biotech, AL, USA).

For mass spectrometry analysis, proteins were concentrated using trichloroacetic acid (TCA) precipitation. Briefly, immunoprecipitated proteins were resuspended in 20% TCA and incubated for 15min on ice before centrifugation at 13 000 g for 20min at 4°C. Pellets were resuspended in 10% TCA and washed twice in cold acetone with intermediate centrifugations at 13 000 g for 10min at 4°C. Finally, samples were air-dried and sent for analysis to the Taplin Biological Mass Spectrometry Facility (Harvard Medical School, Boston, USA).

Immunofluorescence

Cells grown in 12 Well Chamber slides (Ibidi®, Germany) were fixed with 2% paraformaldehyde for 10min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 30min and incubated with anti-53BP1 (4937, CST, MA, USA) or anti-γH2AX (05-636, Merck) for 1h at RT. After washing with PBS, cells were incubated with anti-rabbit Alexa Fluor® 488 Conjugate (4412, CST) or anti-mouse Alexa Fluor® 594 Conjugate (8890, CST) for 30min at RT. Slides were next stained with VECTASHIELD® with DAPI (Vector Laboratories, CA, USA). Analysis was performed with ImageJ.

Chromosome FISH

Cells were arrested in metaphase with 100ng/mL Colcemid™ KaryoMAX™ (ThermoFisher Scientific) for 1h before collection and resuspension in hypertonic 75mM KCl solution for 20 min at 37°C. Cells were then fixed in 3:1 methanol/acetic acid (vol:vol) and dropped onto glass slides. Metaphases were fixed in 4% formaldehyde for 2min and dehydrated with successive 2min incubations in 70%, 90%, and 100% ethanol. The telomeric TelC-Cy3 probe (PNA Bio Inc, CA, USA) was spread on slides after dilution at 500nM in 70% formamide, 20mM Tris-HCl pH 7.4, and 1% Blocking Reagent (Roche, Switzerland). DNA was denatured at 80°C for 5 min and hybridized at RT for 1h30 in the dark. Slides were washed 2x15 min in 70% formamide and 3x5 min in 50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, and 0.05% Tween-20. Slides were next dehydrated with successive 70%, 90%, and 100% ethanol baths and stained with VECTASHIELD® with DAPI (Vector Laboratories). Analysis was performed with ImageJ.

Results

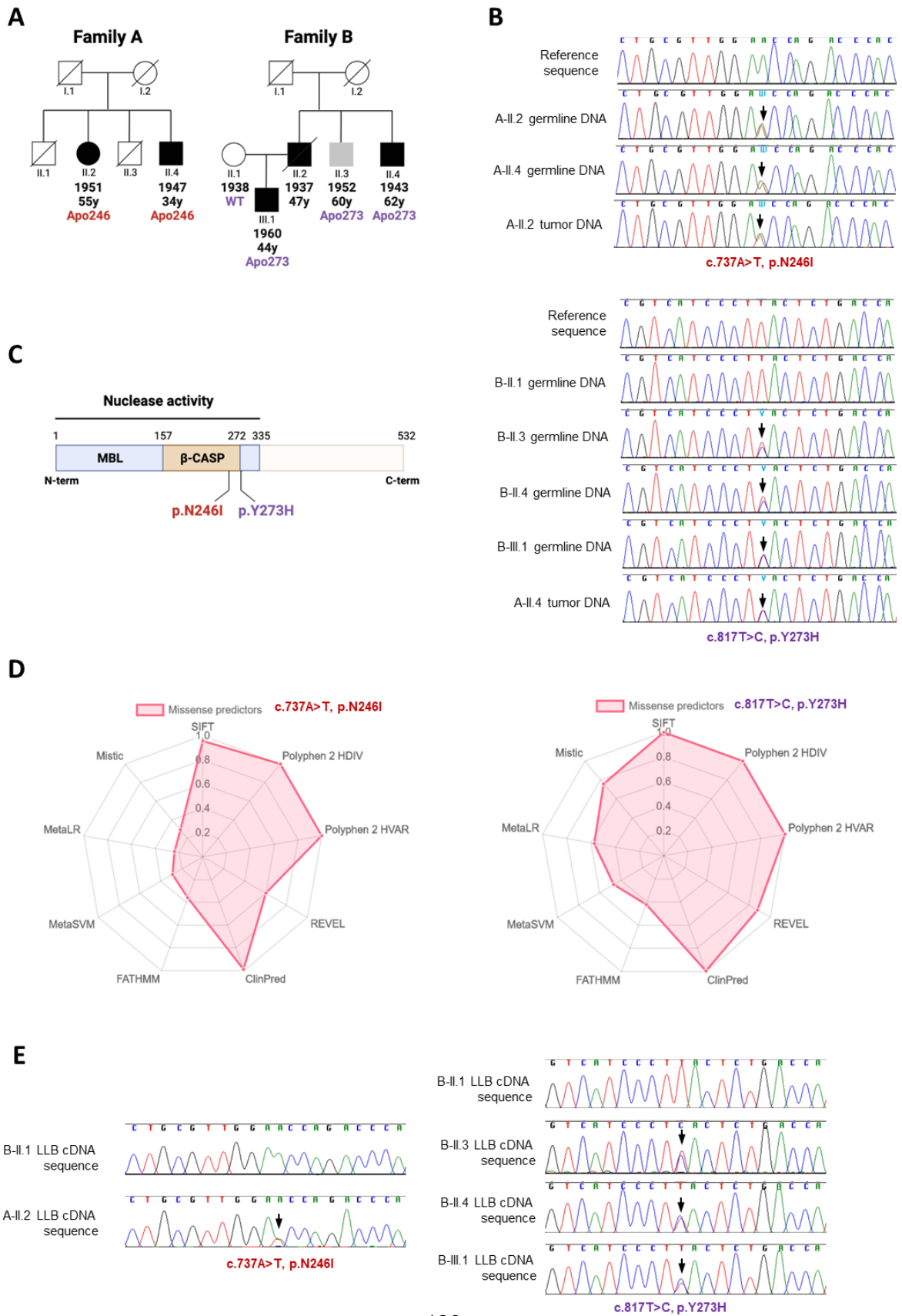
Identification of two missense variants in *DCLRE1B/Apollo* gene in two families with ccRCC

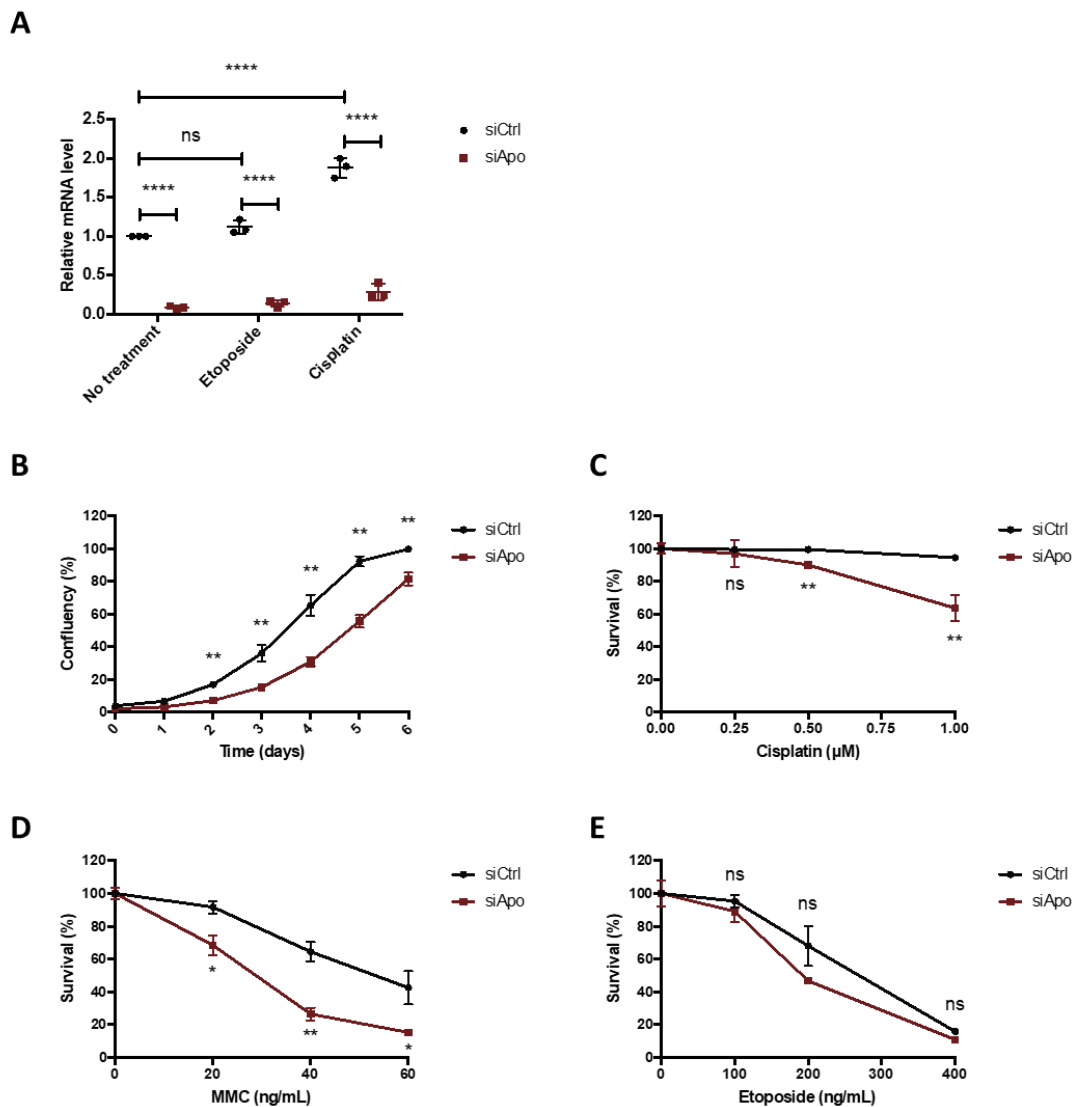
The two families studied presented two (Family A) and three (Family B) affected cases of ccRCC (fig1A). As no germline mutation was detected in known predisposition genes, we searched by Whole Exome Sequencing (WES) for the presence of potentially pathogenic variants in new genes. The common point between the two families was the presence of a germline missense variant detected in the *DCLRE1B/Apollo* gene co-segregating with ccRCC (fig1B). Affected individuals from family A carried a c.737A>T, p.Asn246Ile (i.e. N246I) *Apollo* variant while affected individuals from family B harbored a c.817T>C, p.Tyr273His (i.e. Y273H) *Apollo* variant. In both families, the variants were detected at heterozygous state. The *Apollo* variants were also detected in the available tumors, indicating an absence of loss of heterozygosity (LOH). Both variants are absent in databases including large sequencing

studies on normal populations (gnomAD), patient cohorts (Clinvar) and tumor series (COSMIC). Both *Apollo* missense variants are located in the metallo- β -lactamase (MBL) domain that exerts the exonuclease activity [45] (fig1C). To evaluate the possible impact of these variants, an *in silico* analysis was performed using MobiDetails. The different tools included in this package analyze the conservation of the protein sequence across species, the physico-chemical characteristics of the exchanged amino acids and estimate a putative deleterious effect. These tools predicted a high impact and a damaging effect of both *Apollo* variants (fig1D). Finally, we tested whether the variants could affect the *Apollo* transcripts' stability. Sanger sequencing of *Apollo* cDNA obtained from affected patient's lymphoblastoid cell lines (LLB) similarly detected the wild-type and mutated sequences (fig1E). This result indicates that the two variants do not impact the stability of *Apollo* mRNA.

[Figure 1: Identification of missense variants in the *Apollo* gene within two different families affected by ccRCC. A Pedigree of the two families. Affected patients with ccRCC are in black (except one in gray with melanoma). Birth date and age of diagnosis are indicated below symbols, with *Apollo* status after sequencing of blood DNA: wild-type (WT) or mutated with the specific mutation (corresponding to amino-acid 246 for family A and 273 for family B). **B** Sequencing of the *Apollo* gene for individuals from pedigrees showed in **A**. The chromatograms correspond to Sanger sequencing of families A (left panel) and B (right panel). The arrows show the corresponding missense variants detected in either germline or tumor DNA extracted from available patient samples. **C** Schematic representation of the *Apollo* protein. The 532 amino-acid isoform contains two domains that exert the nuclease activity: metallo- β -lactamase (MBL) and β -CPSF-Artemis-SNM1-PSO2 (β -CASP). Both missense variants identified in families presented in **A** are indicated by the same color code. **D** Partial results extracted from MobiDetails software report for *in silico* analyses of missense variants detected in *Apollo* in families A (left panel) and B (right panel). These polar graphs present 9 tools used to estimate the functional impact of the amino acid changes of the protein; the larger the pink zone, the most deleterious effect on the function. Both variants identified in *Apollo* are evaluated as probably damaging. **E** Sequencing chromatograms showing the *Apollo* sequence of cDNA obtained from lymphoblastoid cell line (LLB) transcripts for both families.]

Figure 1





[Figure 2: Effect of *Apollo* downregulation on proliferation and survival in human renal epithelial cells. A *Apollo* transcripts quantification relative to control genes *PPIA* and *HPRT1* in the HKC8 cells transfected with siRNA targeting *Apollo* (siApo) or non-specific siRNA (siCtrl). Cells were treated with etoposide (25 μ g/mL) and cisplatin (25 μ M) for 16h. Mean and standard deviation of 3 independent experiments. Statistics derived from two-way ANOVA with $\alpha=0.05$. ns: non-significant, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, ****: $p<0.0001$. **B** Proliferation of siApo and siCtrl HKC8 cells without treatment. Mean and standard deviation of triplicates are represented. Representative of 2 independent experiments. **C-E** Sensitivity of siApo and siCtrl HKC8 cells to cisplatin (**C**), mitomycin C (MMC) (**D**) and etoposide (**E**). Mean and standard deviation of triplicates. Representative of 2 independent experiments. Statistics derived from unpaired T-tests with $\alpha=0.05$. ns: non-significant, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, ****: $p<0.0001$.]

Effect of *Apollo* downregulation and deletion on DNA repair in human renal epithelial cells

Apollo was reported to be involved in the DNA repair of ICLs and DSBs [22]–[25]. However, its DNA repair activity was never studied in human renal epithelial cells. Thus, we investigated the impact of *Apollo* downregulation in the HKC8 cell line derived from a healthy human renal proximal tubular epithelium. HKC8 cells were transfected with a siRNA pool targeting *Apollo* (siApo) for 24h before adding ICL-inducing (cisplatin) or DSB-inducing (etoposide) drugs for an additional 16-24h. In HKC8 cells, the amount of endogenous *Apollo* is too low to be detected by Western blotting, even after immunoprecipitation, as previously reported in other cell models [23], [27], [30], [46]. We then assessed the knockdown efficiency by RT-qPCR and demonstrated that *Apollo* mRNA level was decreased by more than 80% compared to cells transfected with a siRNA control (siCtrl) (fig 2A). Compared to untreated cells, a significant increase in the *Apollo* mRNA level was detected upon cisplatin treatment, suggesting an upregulation and/or mRNA stabilization in response to this ICL-inducing drug. On the other hand, the *Apollo* mRNA level was not significantly modified upon treatment with etoposide. To determine the impact of *Apollo* downregulation in response to ICLs and DSBs, we evaluated the long-term survival of HKC8 cells in presence of increasing drug concentrations over 5-7 days. *Apollo* downregulation alone was sufficient to induce a reduced proliferation capacity of siApo HKC8 cells compared to control cells (fig 2B). Furthermore, *Apollo* knockdown increased the sensitivity of HKC8 cells to cisplatin and mitomycin C (MMC), another ICL-inducing drug (fig 2C). On the other hand, no difference was detected between siApo HKC8 and siCtrl HKC8 cells in presence of etoposide (fig 2D).

In order to further characterize the impact of *Apollo* deficiency in our renal cell line model, we generated CRISPR/Cas9-induced HKC8 knock out (*Apollo*^{-/-}) cell line. Among isolated clones, one showed absence of *Apollo* mRNA when using two different pairs of primers (fig 3A, 3B). Consistent with the results obtained in siApo HKC8 cells, we observed a reduced proliferation

of HKC8 *Apollo*^{-/-} cells as compared to parental HKC8 cells (fig 3C). The diminished proliferation capacity of HKC8 *Apollo*^{-/-} was associated with an increased number of spontaneous 53BP1 and γ H2AX foci, showing an accumulation of DNA damage (fig 3D). These results suggest that the endogenous cellular stress detected in HKC8 *Apollo*^{-/-} cells may result from an impaired DNA repair pathway.

In accordance with the results obtained in siApo HKC8 cells, HKC8 *Apollo*^{-/-} cells exhibited an increased sensitivity to cisplatin and MMC (fig 3E, 3F), while no difference was detected after etoposide treatment (fig 3G).

[Figure 3: Effect of *Apollo* knock-out on proliferation, survival, and DNA damage in human renal epithelial cells. A Schematic representation of the *Apollo* gene with the location of gRNA for CRISPR/Cas9 targeting and primer pairs 1 and 2 used in RT-qPCR. **B** *Apollo* transcripts quantification relative to control genes *PPIA* and *HPRT1* in parental and *Apollo*^{-/-} HKC8 cells with both primer pairs by RT-qPCR. Mean and standard deviation of 3 independent experiments are represented. **C** Proliferation of parental and *Apollo*^{-/-} HKC8 cells without treatment. Mean and standard deviation of triplicates are represented. Representative of 3 independent experiments. **D** Quantification of 53BP1 and γ H2AX foci in untreated parental and *Apollo*^{-/-} HKC8 cells. Median and interquartile range with $n \geq 200$. Representative of 3 independent experiments. **E-G** Sensitivity of parental and *Apollo*^{-/-} HKC8 cells to cisplatin (**E**), mitomycin C (**F**) and etoposide (**G**). Mean and standard deviations of triplicates are represented. Representative of 3 independent experiments. All statistics are derived from unpaired T-tests with $\alpha=0.05$. ns: non-significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.]

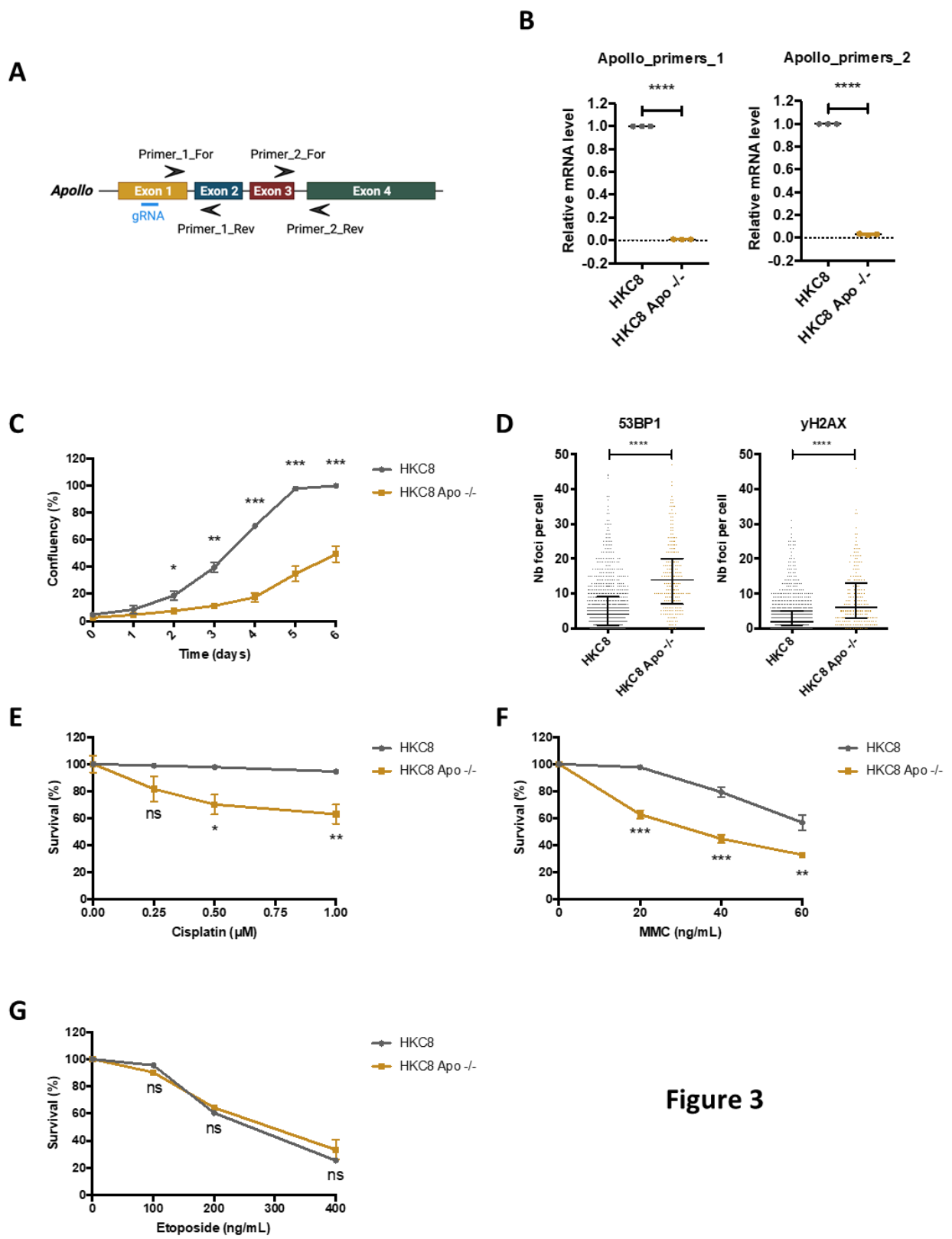


Figure 3

Overall, these results suggest that Apollo plays an important role in DNA repair in the absence of genotoxic stress or following ICLs induction in the human renal cell line HKC8, while it does not seem to participate in the repair of DSBs induced by etoposide in these cells.

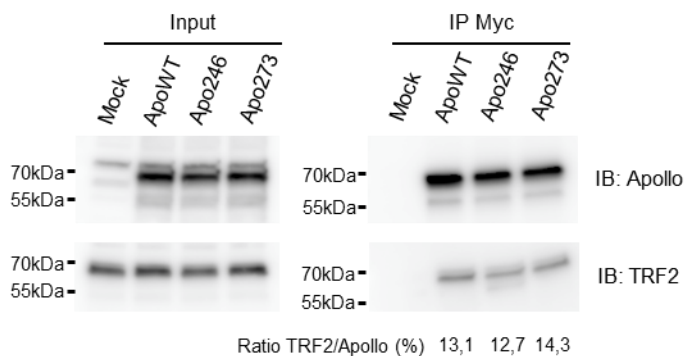
Apollo-TRF2 interaction in HKC8 cells and study of the impact of the *Apollo* mutations

Apollo was reported to interact with many proteins in different cell models, including DNA repair proteins [21]. We then asked whether some of Apollo's partners could be detected in our renal cell model. To investigate these interactions, we carried out immunoprecipitation (IP) experiments against Myc in HKC8 cells transiently transfected with a Myc-tagged *Apollo* encoding vector or the corresponding empty vector. Fractions resulting from IP were analyzed by mass spectrometry. Apart from Apollo itself, the most abundant proteins identified in IP fractions were TRF2 and Rap1 (fig 4A).

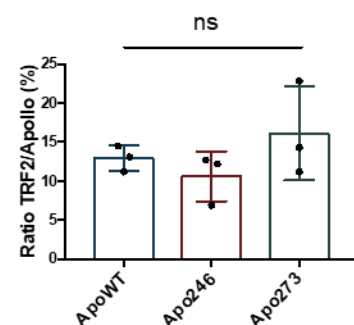
A

Gene symbol	Protein	Annotation	Nb Peptides (Unique)		
<i>DCLRE1B</i>	Apollo	5' exonuclease Apollo	13	9	19
<i>TERF2</i>	TRF2	Telomeric repeat-binding factor 2	12	8	5
<i>TERF2IP</i>	Rap1	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	10	9	7

B



C



[Figure 4: WT and *Apollo* mutants similarly interact with TRF2 in the HKC8 cell line. A List of proteins identified by mass spectrometry that co-immunoprecipitated with Apollo WT-Myc. The number of unique peptides (peptide sequences assigned to a unique protein) is

indicated for each of the 3 independent experiments performed. **B** Co-immunoprecipitation of endogenous TRF2 with exogenous Apollo^{WT}-Myc (ApoWT), Apollo^{N246I}-Myc (Apo246), or Apollo^{Y273H}-Myc (Apo273). Inputs represent 2% of the total protein extracts used for immunoprecipitation. Numbers under the gel indicate the band signal intensity ratio of TRF2/Apollo. Mock: Empty vector. **C** Quantification of the relative TRF2/Apollo ratio as presented in **B**. Mean and standard deviations from 3 independent experiments are represented. Statistic derived from one-way ANOVA with $\alpha=0.05$. ns: non-significant.]

While TRF2 is a well-known direct partner of Apollo, Rap1 interaction was previously suggested to be indirectly mediated through TRF2 [27]. As the interaction with TRF2 was reported to be essential for Apollo's location and activity at telomeres [30], [32], we wondered whether the mutations could affect this interaction. Thus, we performed immunoblots (IB) following immunoprecipitations (IP) of cellular extracts from HKC8 cells transiently transfected with a vector encoding the different Myc-tagged forms of Apollo (Apollo^{WT}, Apollo^{N246I}, Apollo^{Y273H}). Similar levels of Apollo were detected in the input fractions indicating that the mutations did not seem to affect protein stability, at least not in this exogenous context (fig 4B). In addition, no noticeable changes in TRF2 stability were detected upon expression of the different forms of Apollo. Finally, there was no significant impact of *Apollo* mutations on the strength of its interaction with TRF2 (fig 4B, 4C). As this interaction was unaffected by the mutations, it suggests that Apollo mutants keep the ability to localize at telomeres, raising the question of the functional impact of these mutations on telomere protection.

Apollo^{WT} protects telomeres in HKC8 cells by contrast to Apollo^{N246I} and Apollo^{Y273H} mutants

To explore the functional impact of Apollo mutants on telomere protection, we generated stable cell lines expressing the different forms of *Apollo* by transfecting HKC8 *Apollo*^{-/-} cells with the Myc-tagged Apollo (Apollo^{WT}, Apollo^{N246I}, Apollo^{Y273H}) expression vectors. The transfected cells were kept under antibiotic selection pressure for two weeks to force integration of the *Apollo* transgenes into the genome. Despite this constant pressure, the *Apollo* mRNA levels in the

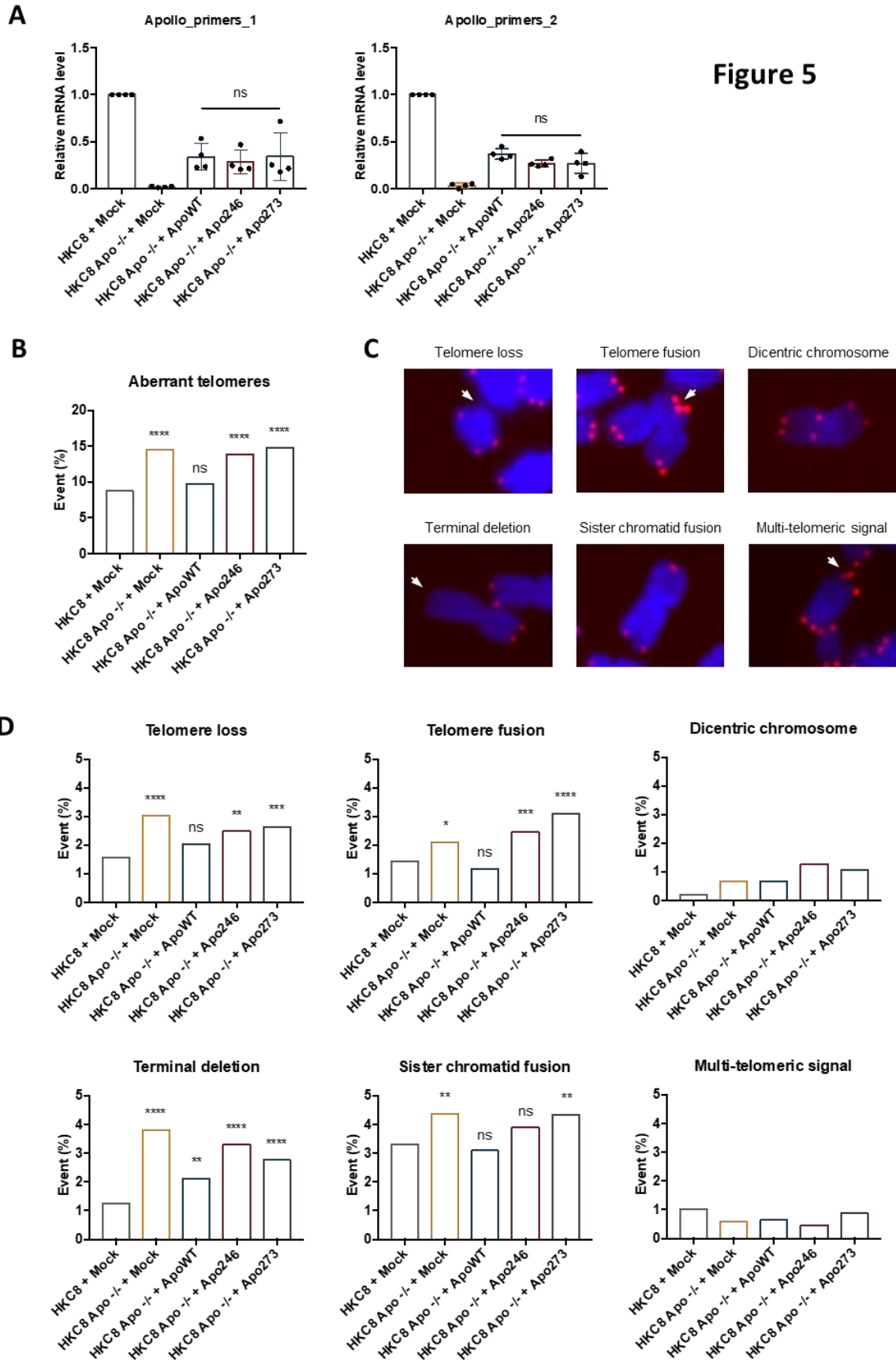
resulting stable cell lines were only 25% of those measured in parental HKC8 cells (fig 5A, 3A). This result was highly reproducible as similar mRNA levels were measured in four independent stable cell line transfection experiments. We hypothesized that high *Apollo* expression induced by the constitutive pCMV promoter may generate excessive cellular toxicity leading to the selection of low-expressing clones in our renal cell model. This toxicity would explain why the endogenous *Apollo* protein level remains too low to be detected. Noteworthy, *Apollo* mRNA levels were similar between wild-type and mutants indicating that the mutations do not affect exogenous *Apollo* transcript stability, consistent with our previous results obtained for protein stability after transient transfections (fig 4B, 5A).

To assess telomere aberrations in our different cell lines, we performed chromosome Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) with a DNA probe specifically targeting the telomere (TTAGGG)_n repeats. This approach detected a significant increase in the frequency of telomere aberrations in the HKC8 *Apollo*^{-/-} cell line transfected with the empty vector (Mock) as compared to the parental HKC8 cell line (fig 5B). This telomere phenotype was rescued upon *Apollo*^{WT} transfection, demonstrating a causal link between *Apollo* loss and telomere instability. Interestingly, transfection of either *Apollo*^{N246I} or *Apollo*^{Y273H} in HKC8 *Apollo*^{-/-} cells did not reduce the rate of telomere aberrations, indicating a complete failure of the mutants to rescue the HKC8 *Apollo*^{-/-} phenotype (fig 5B). The telomere aberrations detected in the *Apollo*^{N246I} and *Apollo*^{Y273H} expressing *Apollo*^{-/-} HKC8 cell lines were similar to those of HKC8 *Apollo*^{-/-} cells. This included an increase in the frequency of single and double telomeric signal losses (telomere loss and terminal deletion) (fig 5C, 5D) and a higher rate of chromatid fusions (telomere fusion and sister chromatid fusion) as compared to HKC8 cells. An increase in sister chromatid fusions was also observed in *Apollo*^{-/-} HKC8 cells expressing both mutants although only statistically significant in *Apollo*^{-/-} HKC8 cell line expressing *Apollo*^{Y273H}. In this setting, frequencies of dicentric chromosomes and multi-telomeric signals were rather low.

Overall, these results demonstrate that *Apollo* deletion in a human renal cell model results in an increased frequency of telomere aberrations reflecting defective telomere protection. Conversely to *Apollo*^{WT}, the mutants failed to rescue the telomere defects observed in *Apollo*^{-/-} HKC8 cell line. Thus, both *Apollo*^{N246I} and *Apollo*^{Y273H} are loss-of-function mutants regarding the telomere protective role of *Apollo* in human renal cells.

[Figure 5: Telomere aberrations associated with WT and mutants *Apollo* expression. A *Apollo* transcripts quantification relative to control genes *PPIA* and *HPRT1* in parental and *Apollo*^{-/-} HKC8 stable cell lines expressing *Apollo*^{WT} (*ApoWT*), *Apollo*^{N246I} (*Apo246*), *Apollo*^{Y273H} (*Apo273*), or the control empty vector (Mock). Both primer pairs were used for RT-qPCR experiments. Mean and standard deviations from 4 independent stable transfection experiments are represented. Statistic derived from one-way ANOVA with $\alpha=0.05$. ns: non-significant. **B** Quantification of global telomere aberrations detected by FISH in parental and *Apollo*^{-/-} HKC8 stable cell lines expressing *Apollo*^{WT} (*ApoWT*), *Apollo*^{N246I} (*Apo246*), *Apollo*^{Y273H} (*Apo273*), or the control empty vector (Mock). Results represent the frequency of aberrations from 4 independent stable transfection experiments. Number of chromosomes analyzed: HKC8+Mock: n=4033; HKC8 *Apo*^{-/-} +Mock: n=3810; HKC8 *Apo*^{-/-} +*ApoWT*: n=3591; HKC8 *Apo*^{-/-} +*Apo246*: n=4229; HKC8 *Apo*^{-/-} +*Apo273*: n=3557. Statistics were derived from the chi-square test with HKC8+Mock as reference and $\alpha=0.05$. ns: non-significant, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001. **C** Representative pictures of telomere aberrations counted in **B** and **D**. **D** Detailed classification of telomere aberrations from **B**.]

Figure 5



Discussion

Apollo is a key player in the maintenance of genome stability through its involvement in DNA repair and telomeres protection. Associated with this last activity, *Apollo* was previously identified as a causal gene in the HH syndrome, a severe telomere biology disorder [34], [37], [38]. In our study, we identified two *Apollo* missense variants co-segregating with ccRCC in two unrelated families. These *Apollo* variants, also detected in tumor DNA, have never been reported elsewhere to the best of our knowledge. Analysis of the transcripts indicated that the variants do not impact *Apollo* mRNA stability and immunoblot similarly detected exogenous WT and mutated *Apollo*, indicating that the mutations do not seem to impair *Apollo* protein stability. However, *in silico* analyses predicted the patients' mutations to be damaging, which prompted us to investigate the role of *Apollo* in human kidney cells and examine the functional impact of these mutants.

Apollo was previously shown to be involved in the repair of ICLs, DSBs, and replicative stress in various cell lines but never in an epithelial renal cell model. In this study, we examined the role of *Apollo* in the HKC8 cell line originating from the proximal renal tubular epithelium. The downregulation and deletion of *Apollo* in HKC8 cells resulted in an increased sensitivity to MMC and cisplatin, indicating a role for *Apollo* in the repair of ICLs, which was consistent with previously published data in other cell lines [22], [23], [25]. In contrast, no significant impact was detected in response to DSBs arising from exposure to etoposide, a topoisomerase 2 inhibitor. The involvement of *Apollo* in the repair of DSBs has been previously debated as Demuth and colleagues reported an impact of *Apollo* knockdown in response to ionizing radiation (IR)-induced DSBs in HeLa [23] and U2OS cells [46] while no effect was reported by other groups in HEK293T [22] and the DT40 chicken cell line [47]. Considering these different results, one can suggest that *Apollo*'s role in response to DSBs may depend on multiple factors including species and cell types. Noteworthy, although ICLs and DSBs are often presented as separated damage, the generation of DSBs is the step which follows ICL unhooking during the

replication-coupled repair in the FANC/BRCA pathway. Since Apollo was shown to function in the FANC/BRCA pathway, it could be involved in DSBs processing in this context [25], [46]. Interestingly, in the absence of exogenous stress, HKC8 *Apollo*^{-/-} cells exhibited increased numbers of 53BP1 and γH2AX foci, indicating the generation of DSBs. Apart from ICL repair, Apollo was also reported to participate in the FANC/BRCA pathway to solve replication stress caused by fork stalling [26]. Thus, the phenotype observed in the HKC8 *Apollo*^{-/-} cell line may reflect the onset of DNA breaks arising from such unresolved replicative stress.

Taken together, our results are consistent with a role for Apollo in the FANC/BRCA pathway for the resolution of endogenous and ICL-induced replicative stress in the renal cell line model HKC8. However, the precise role of Apollo in this pathway remains elusive and should be further investigated.

In agreement with other studies performed in different cell models, Apollo interacts with TRF2 in HKC8 cells. Recently, *Apollo* missense mutants affecting residue Leu142, even though outside of the TRF2-binding domain (amino acids 496 to 532), were shown to reduce the affinity for TRF2 [34], which prompted us to examine the impact of the *Apollo*^{N246I} and *Apollo*^{Y273H} mutations on this interaction. Our co-immunoprecipitation experiments did not reveal significant impact of *Apollo*^{N246I} and *Apollo*^{Y273H} mutations regarding the Apollo-TRF2 interaction. This result supports the idea that *Apollo*^{N246I} and *Apollo*^{Y273H} could co-exist with *Apollo*^{WT} at telomeres in patients' cells. When studying telomere integrity in renal cells, we showed that the lack of *Apollo* resulted in a phenotype characterized by increased telomere damage, consistent with previous studies performed in other cells [27], [30], [32]–[34]. Telomere instability in the HKC8 *Apollo*^{-/-} cells was rescued by the expression of *Apollo*^{WT}, but not by that of *Apollo*^{N246I} or *Apollo*^{Y273H}, suggesting that both of them are loss-of-function mutants regarding telomere protection. *Apollo*^{N246I} and *Apollo*^{Y273H} are respectively located in the β-CASP and MBL domains responsible for the nuclease activity of the protein. In particular, the *Apollo*^{Y273H} mutation is located in the essential “phosphate binding pocket” structure near

the Asp275 residue which, when mutated, completely disrupts the nuclease activity [48]. Thus, the telomere phenotype reported in this study may be explained by the impairment or disruption of Apollo nuclease activity. This hypothesis is supported by the fact that the expression of Apollo nuclease-dead mutants results in a failure to rescue telomere damage [32], [33]. It would be interesting to study the nuclease activity of the Apollo mutants on DNA substrates *in vitro*. However, production of the full-length Apollo recombinant protein remains a challenge probably due to the toxicity of *Apollo* overexpression in diverse biological systems, from prokaryotes to eukaryotes (personal communications).

Several genome-wide association studies previously highlighted correlations between *Apollo* SNP and different types of cancers [39]–[41]. In particular, the breast cancer-associated *Apollo* SNP rs11552449 (c.181C>T, p.His61Tyr) [40] was shown to increase the amount of Apollo transcripts including exon 2 and to result in higher ICLs and DSBs sensitivity in LLB cell lines generated from heterozygous carrier patients [41], [49]. Until now, these were the only studies suggesting a causal association between *Apollo* and cancer. In our study, we demonstrated a significant telomere deprotection in *Apollo*^{-/-} renal HKC8 cells expressing the *Apollo*^{N246I} and *Apollo*^{Y273H} mutants. To date, this type of *Apollo*-associated telomere phenotype has only been associated with HH syndrome arising very early in life [34], [37]. Interestingly, patients with the telomere biology disorder dyskeratosis congenita are predisposed to develop cancers, especially head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and leukemia [50], [51]. In addition, a recent large-scale study demonstrated an association between cancer, mostly leukemia, and heterozygous germline mutations in telomerase and other telomere-maintenance genes [52]. As a shelterin complex-associated protein, Apollo may thus be considered as a new gene of interest in cancer predisposition. In fact, while high-degree Apollo dysfunctions are more likely to drive severe and early onset pathologies such as HH syndrome, one can imagine that in a heterozygous context, a more moderate phenotype could arise later in life due to the co-expression of the mutated and WT alleles. Thus, our current hypothesis is

that RCC patients carrying heterozygous *Apollo*^{N246I} or *Apollo*^{Y273H} mutations combined with an *Apollo*^{WT} allele would be subjected to *Apollo* haploinsufficiency, leading to partial telomere fragility.

To conclude, we showed that the *Apollo*^{N246I} and *Apollo*^{Y273H} mutants identified in patients with ccRCC fail to protect telomere in a human renal cell line model. These results suggest that both *Apollo* mutants could participate in the onset of chromosome instability leading to oncogenesis in renal cells and emphasize the need to further explore the role of *Apollo* deficiency as a new putative driver of renal oncogenesis.

Acknowledgements

We thank the patients for their participation. We are grateful to “Centres de Ressources Biologiques” (CRB) from Necker and Cochin Hospitals for fixed tumors. We also thank Nathalie Droin for WES, Marc Deloger for bioinformatic analyses, and Brigitte Bressac for *in silico* analyses. This work was supported by grants from: “Fondation ARC”, “Ligue Contre le Cancer Comité du Val de Marne (94)”, “Ligue Comité des Yvelines (78)”, Ligue Comité de l’Indre (36), “Association pour la Recherche sur les Tumeurs du Rein” (A.R.Tu.R.), and “Taxe d’Apprentissage Gustave Roussy” (P25_MADU).

References

- [1] W. M. Linehan *et al.*, “The Metabolic Basis of Kidney Cancer,” *Cancer Discov.*, vol. 9, no. 8, pp. 1006–1021, Aug. 2019, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1354.
- [2] J. J. Hsieh *et al.*, “Renal cell carcinoma,” *Nat. Rev. Dis. Primer*, vol. 3, Mar. 2017, doi: 10.1038/NRDP.2017.9.
- [3] H. Hasumi and M. Yao, “Hereditary kidney cancer syndromes: Genetic disorders driven by alterations in metabolism and epigenome regulation,” *Cancer Sci.*, vol. 109, no. 3, pp. 581–586, Mar. 2018, doi: 10.1111/CAS.13503.
- [4] F. Latif *et al.*, “Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene,” *Science*, vol. 260, no. 5112, pp. 1317–1320, 1993, doi: 10.1126/SCIENCE.8493574.
- [5] C. J. Creighton *et al.*, “Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma,” *Nature*, vol. 499, no. 7456, pp. 43–49, 2013, doi: 10.1038/NATURE12222.
- [6] T. K. Choueiri and W. G. Kaelin, “Targeting the HIF2-VEGF axis in renal cell carcinoma,” *Nat. Med.*, vol. 26, no. 10, pp. 1519–1530, Oct. 2020, doi: 10.1038/S41591-020-1093-Z.
- [7] Linehan WM *et al.*, “Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 374, no. 2, pp. 135–145, Jan. 2016, doi: 10.1056/NEJMOA1505917.
- [8] C. F. Davis *et al.*, “The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma,” *Cancer Cell*, vol. 26, no. 3, pp. 319–330, 2014, doi: 10.1016/J.CCR.2014.07.014.
- [9] P. R. Benusiglio *et al.*, “A germline mutation in PBRM1 predisposes to renal cell carcinoma,” *J. Med. Genet.*, vol. 52, no. 6, pp. 426–430, 2015, doi: 10.1136/JMEDGENET-2014-102912.

- [10] T. Popova *et al.*, “Germline BAP1 mutations predispose to renal cell carcinomas,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 92, no. 6, pp. 974–980, Jun. 2013, doi: 10.1016/J.AJHG.2013.04.012.
- [11] B. Shuch *et al.*, “Germline PTEN mutation Cowden syndrome: an underappreciated form of hereditary kidney cancer,” *J. Urol.*, vol. 190, no. 6, pp. 1990–1998, 2013, doi: 10.1016/J.JURO.2013.06.012.
- [12] Schmidt L *et al.*, “Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas,” *Nat. Genet.*, vol. 16, no. 1, pp. 68–73, 1997, doi: 10.1038/NG0597-68.
- [13] S. Turajlic *et al.*, “Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal,” *Cell*, vol. 173, no. 3, pp. 595-610.e11, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.CELL.2018.03.043.
- [14] T. R. Hartman *et al.*, “Prevalence of pathogenic variants in DNA damage response and repair genes in patients undergoing cancer risk assessment and reporting a personal history of early-onset renal cancer,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-70449-5.
- [15] J. C. Na, N. Nagaya, K. H. Rha, W. K. Han, and I. Y. Kim, “DNA Damage Response Pathway Alteration in Locally Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma Is Associated With a Poor Outcome,” *Clin. Genitourin. Cancer*, vol. 17, no. 4, pp. 299–305, 2019, doi: 10.1016/j.clgc.2019.05.004.
- [16] Y. Ged *et al.*, “DNA damage repair pathway alterations in metastatic clear cell renal cell carcinoma and implications on systemic therapy,” *J. Immunother. Cancer*, vol. 8, no. 1, p. e000230, Jun. 2020, doi: 10.1136/JITC-2019-000230.
- [17] E. Guo, C. Wu, J. Ming, W. Zhang, L. Zhang, and G. Hu, “The Clinical Significance of DNA Damage Repair Signatures in Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *Front. Genet.*, vol. 11, Jan. 2021, doi: 10.3389/FGENE.2020.593039.

- [18] S. E. Scanlon, D. C. Hegan, P. L. Sulkowski, and P. M. Glazer, "Suppression of homology-dependent DNA double-strand break repair induces PARP inhibitor sensitivity in VHL-deficient human renal cell carcinoma," *Oncotarget*, vol. 9, no. 4, pp. 4647–4660, 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.23470.
- [19] J. P. Pletcher *et al.*, "The Emerging Role of Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors as Effective Therapeutic Agents in Renal Cell Carcinoma," *Front. Oncol.*, vol. 0, p. 2559, Jul. 2021, doi: 10.3389/FONC.2021.681441.
- [20] R. M. Chabanon *et al.*, "PBRM1 Deficiency Confers Synthetic Lethality to DNA Repair Inhibitors in Cancer," *Cancer Res.*, vol. 81, no. 11, pp. 2888–2902, Jun. 2021, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0628.
- [21] M. Schmiester and I. Demuth, "SNM1B/Apollo in the DNA damage response and telomere maintenance," *Oncotarget*, vol. 8, no. 29, pp. 48398–48409, 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.16864.
- [22] J. B. Bae *et al.*, "Snm1B/Apollo mediates replication fork collapse and S Phase checkpoint activation in response to DNA interstrand cross-links," *Oncogene*, vol. 27, no. 37, pp. 5045–5056, Aug. 2008, doi: 10.1038/ONC.2008.139.
- [23] I. Demuth, M. Digweed, and P. Concannon, "Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation," *Oncogene*, vol. 23, no. 53, pp. 8611–8618, Nov. 2004, doi: 10.1038/SJ.ONC.1207895.
- [24] I. Demuth *et al.*, "Endogenous hSNM1B/Apollo interacts with TRF2 and stimulates ATM in response to ionizing radiation," *DNA Repair*, vol. 7, no. 8, pp. 1192–1201, Aug. 2008, doi: 10.1016/J.DNAREP.2008.03.020.
- [25] J. M. Mason and J. A. M. Sekiguchi, "Snm1B/Apollo functions in the Fanconi anemia pathway in response to DNA interstrand crosslinks," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, no. 13, pp. 2549–2559, Jul. 2011, doi: 10.1093/HMG/DDR153.

- [26] J. M. Mason *et al.*, "The SNM1B/APOLLO DNA nuclease functions in resolution of replication stress and maintenance of common fragile site stability," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 22, no. 24, pp. 4901–4913, Dec. 2013, doi: 10.1093/HMG/DDT340.
- [27] M. van Overbeek and T. de Lange, "Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase," *Curr. Biol. CB*, vol. 16, no. 13, pp. 1295–1302, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.CUB.2006.05.022.
- [28] B. D. Freibaum and C. M. Counter, "hSnm1B is a novel telomere-associated protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 22, pp. 15033–15036, Jun. 2006, doi: 10.1074/JBC.C600038200.
- [29] B. D. Freibaum and C. M. Counter, "The protein hSnm1B is stabilized when bound to the telomere-binding protein TRF2," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 35, pp. 23671–23676, Aug. 2008, doi: 10.1074/JBC.M800388200.
- [30] C. Lenain, S. Bauwens, S. Amiard, M. Brunori, M. J. Giraud-Panis, and E. Gilson, "The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair," *Curr. Biol. CB*, vol. 16, no. 13, pp. 1303–1310, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.CUB.2006.05.021.
- [31] T. de Lange, "Shelterin-Mediated Telomere Protection," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 52, pp. 223–247, Nov. 2018, doi: 10.1146/ANNUREV-GENET-032918-021921.
- [32] P. Wu, M. van Overbeek, S. Rooney, and T. de Lange, "Apollo contributes to G overhang maintenance and protects leading-end telomeres," *Mol. Cell*, vol. 39, no. 4, pp. 606–617, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.06.031.
- [33] Y. C. Lam *et al.*, "SNM1B/Apollo protects leading-strand telomeres against NHEJ-mediated repair," *EMBO J.*, vol. 29, no. 13, pp. 2230–2241, Jul. 2010, doi: 10.1038/EMBOJ.2010.58.

- [34] L. Kermasson *et al.*, “Inherited human Apollo deficiency causes severe bone marrow failure and developmental defects,” *Blood*, vol. 139, no. 16, pp. 2427–2440, Apr. 2022, doi: 10.1182/blood.2021010791.
- [35] P. Wu, H. Takai, and T. De Lange, “Telomeric 3’ overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST,” *Cell*, vol. 150, no. 1, pp. 39–52, Jul. 2012, doi: 10.1016/J.CELL.2012.05.026.
- [36] S. Akhter, Y. C. Lam, S. Chang, and R. J. Legerski, “The telomeric protein SNM1B/Apollo is required for normal cell proliferation and embryonic development,” *Aging Cell*, vol. 9, no. 6, pp. 1047–1056, Dec. 2010, doi: 10.1111/J.1474-9726.2010.00631.X.
- [37] F. Touzot *et al.*, “Function of Apollo (SNM1B) at telomere highlighted by a splice variant identified in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 22, pp. 10097–10102, Jun. 2010, doi: 10.1073/PNAS.0914918107.
- [38] P. Revy, C. Kannengiesser, and A. A. Bertuch, “Genetics of human telomere biology disorders,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 24, no. 2, pp. 86–108, Feb. 2023, doi: 10.1038/S41576-022-00527-Z.
- [39] X. S. Liang *et al.*, “Genetic variants in DNA repair genes and the risk of cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with/without CDKN2A mutations,” *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 9, pp. 2062–2066, May 2012, doi: 10.1002/IJC.26231.
- [40] K. Michailidou *et al.*, “Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk,” *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 4, pp. 353–361, Apr. 2013, doi: 10.1038/NG.2563.
- [41] S. Herwest *et al.*, “The hSNM1B/Apollo variant rs11552449 is associated with cellular sensitivity towards mitomycin C and ionizing radiation,” *DNA Repair*, vol. 72, pp. 93–98, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.DNAREP.2018.09.004.

- [42] R. Natrajan *et al.*, "Delineation of a 1Mb breakpoint region at 1p13 in Wilms tumors by fine-tiling oligonucleotide array CGH," *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 46, no. 6, pp. 607–615, Jun. 2007, doi: 10.1002/GCC.20446.
- [43] F. Adolphe *et al.*, "Germline mutation in the NBR1 gene involved in autophagy detected in a family with renal tumors," *Cancer Genet.*, vol. 258–259, pp. 51–56, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.CANCERGEN.2021.07.003.
- [44] L. C. Racusen *et al.*, "Cell lines with extended in vitro growth potential from human renal proximal tubule: characterization, response to inducers, and comparison with established cell lines," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 129, no. 3, pp. 318–329, 1997, doi: 10.1016/S0022-2143(97)90180-3.
- [45] I. Callebaut, D. Moshous, J. P. Mornon, and J. P. De Villartay, "Metallo-beta-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the beta-CASP family," *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 16, pp. 3592–3601, Aug. 2002, doi: 10.1093/NAR/GKF470.
- [46] B. Salewsky, M. Schmiester, D. Schindler, M. Digweed, and I. Demuth, "The nuclease hSNM1B/Apollo is linked to the Fanconi anemia pathway via its interaction with FANCP/SLX4," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, no. 22, pp. 4948–4956, Nov. 2012, doi: 10.1093/HMG/DDS338.
- [47] M. Ishiai *et al.*, "DNA Cross-Link Repair Protein SNM1A Interacts with PIAS1 in Nuclear Focus Formation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 24, pp. 10733–10741, 2004, doi: 10.1128/MCB.24.24.10733-10741.2004.
- [48] H. T. Baddock *et al.*, "A phosphate binding pocket is a key determinant of exo- versus endo-nucleolytic activity in the SNM1 nuclease family," *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. 16, pp. 9294–9309, Sep. 2021, doi: 10.1093/NAR/GKAB692.
- [49] J. L. Caswell *et al.*, "Multiple breast cancer risk variants are associated with differential transcript isoform expression in tumors," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 24, no. 25, pp. 7421–7431, Dec. 2015, doi: 10.1093/HMG/DDV432.

- [50] B. P. Alter, N. Giri, S. A. Savage, and P. S. Rosenberg, "Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up," *Haematologica*, vol. 103, no. 1, pp. 30–39, Jan. 2018, doi: 10.3324/HAEMATOL.2017.178111.
- [51] B. P. Alter, N. Giri, S. A. Savage, and P. S. Rosenberg, "Cancer in dyskeratosis congenita," *Blood*, vol. 113, no. 26, pp. 6549–6557, 2009, doi: 10.1182/BLOOD-2008-12-192880.
- [52] K. E. Schratz *et al.*, "Cancer spectrum and outcomes in the Mendelian short telomere syndromes," *Blood*, vol. 135, no. 22, pp. 1946–1956, May 2020, doi: 10.1182/BLOOD.2019003264.

IV La surexpression d'*Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-}

1 - Etude par transfections stables

Dans l'article soumis, nous avons montré que la suppression de l'expression d'*Apollo* induit une augmentation de la sensibilité à long-terme des cellules HKC8 au cisplatine et à la MMC (**Article Figures 3E, 3F**). A l'inverse, cette suppression induit une certaine résistance à l'induction de l'apoptose à court-terme en réponse au cisplatine, bien que la raison de cette résistance ne soit pas encore connue (**Figure 26**). Afin d'étudier l'impact de l'expression des formes mutées d'*Apollo* sur l'induction de l'apoptose et la sensibilité à long-terme, des transfections stables ont été réalisées dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-}. Ces lignées sont décrites dans l'article soumis et ont été utilisées pour la quantification des dommages télomériques (**Article Figure 5**).

Comme décrit précédemment, les lignées stables ont été traitées avec du cisplatine pendant 16h puis marquées avec du DIOC et analysées par cytométrie en flux. L'analyse des résultats montre que l'addition du cisplatine induit une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques dans l'ensemble des lignées cellulaires (**Figure 27**). Cependant, les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec un vecteur vide (HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock) présentent un taux d'apoptose inférieur à celui des cellules HKC8 transfectées de façon stable avec le même vecteur vide (HKC8 + Mock) en réponse au cisplatine. Ce résultat est cohérent avec celui précédemment obtenu pour les lignées non transfectées (**Figure 26**). A l'inverse, les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock présentent un taux d'apoptose légèrement supérieur aux cellules HKC8 + Mock en absence de stress génotoxique induit. Il est donc possible que la seule suppression de l'expression d'*Apollo* favorise l'activation de l'apoptose. Les résultats montrent également que les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec le vecteur codant *Apollo*^{WT} (*Apollo*^{-/-} + ApoWT), *Apollo*^{N246I} (*Apollo*^{-/-} + Apo246) ou *Apollo*^{273H} (*Apollo*^{-/-} + Apo273), présentent des taux d'apoptose similaires à celui des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock en absence et en présence de cisplatine. En complément de l'étude de l'apoptose, quelques expériences préliminaires ont également été réalisées pour évaluer la sensibilité à long-terme des lignées stables en réponse au cisplatine par suivi de l'évolution de la confluence cellulaire sur plusieurs

jours. Cependant, de manière similaire aux résultats présentés pour l'induction de l'apoptose, ces quelques expériences n'ont pas permis d'observer de différence entre les lignées HKC8 *Apollo*^{-/-} stables (résultats non présentés). Nous avons montré dans l'article soumis que le niveau d'ARNm *Apollo* dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable demeure toujours largement inférieur à celui des cellules HKC8 parentales, probablement en raison d'une toxicité associée à la surexpression d'*Apollo* (**Article Figure 5A**). Il est donc probable que l'absence de différence concernant l'activation de l'apoptose et la sensibilité à long-terme entre les différentes lignées HKC8 *Apollo*^{-/-} stables soit expliquée par le faible niveau de réexpression d'*Apollo* dans ces lignées.

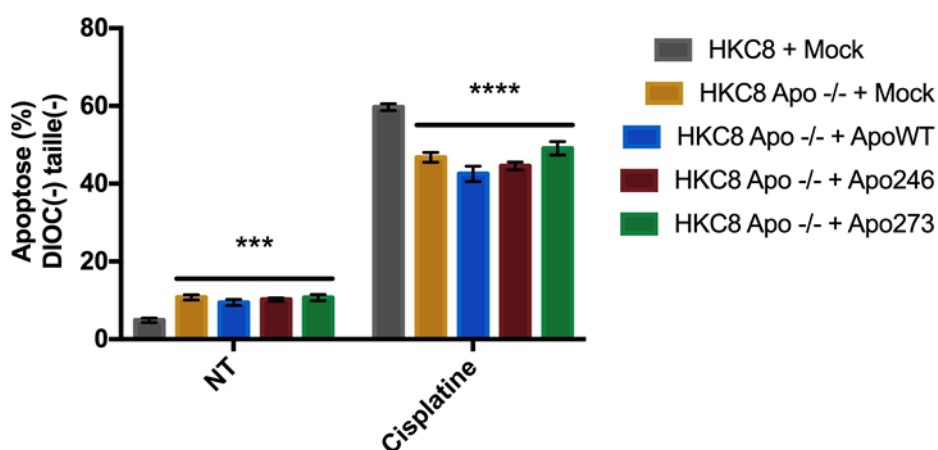


Figure 27 : Analyse de l'induction de l'apoptose en réponse aux ICLs dans les cellules HKC8 et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec un vecteur vide, *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}.

Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules apoptotiques des cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable en absence de traitement et après un traitement au cisplatine (25 μ M) pendant 16h. Les moyennes et écart-types de triplicats biologiques sont représentés. Résultats représentatifs de deux expériences indépendantes. Les valeurs statistiques découlent d'une analyse ANOVA bivariée par rapport à la condition HKC8 + Mock avec $\alpha=0,05$. *** : $p<0,001$, **** : $p<0,0001$.

2 - Etude par transfections transitoires

Compte tenu des problèmes d'expressions trop faibles dans les lignées stables, nous avons poursuivi notre étude de la sensibilité des cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} avec ou sans *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H} par transfections transitoires afin d'obtenir des niveaux d'expressions plus importants. En effet, les transfections transitoires permettent d'induire une forte réexpression d'*Apollo*, suffisante pour détecter la protéine en Western blot (**Article Figure 4B**). Pour cette étude, les cellules HKC8 parentales ou HKC8 *Apollo*^{-/-} ont étéensemencées à faible densité cellulaire en présence de concentrations croissantes de cisplatine 24h après avoir été transfectées avec un vecteur pcDNA3-Myc vide ou codant les différentes formes d'*Apollo*. L'évolution de la population cellulaire a été évaluée 6 jours après le début du traitement grâce aux mesures réalisées par l'Incucyte, un automate permettant de mesurer le pourcentage de confluence des cellules adhérentes.

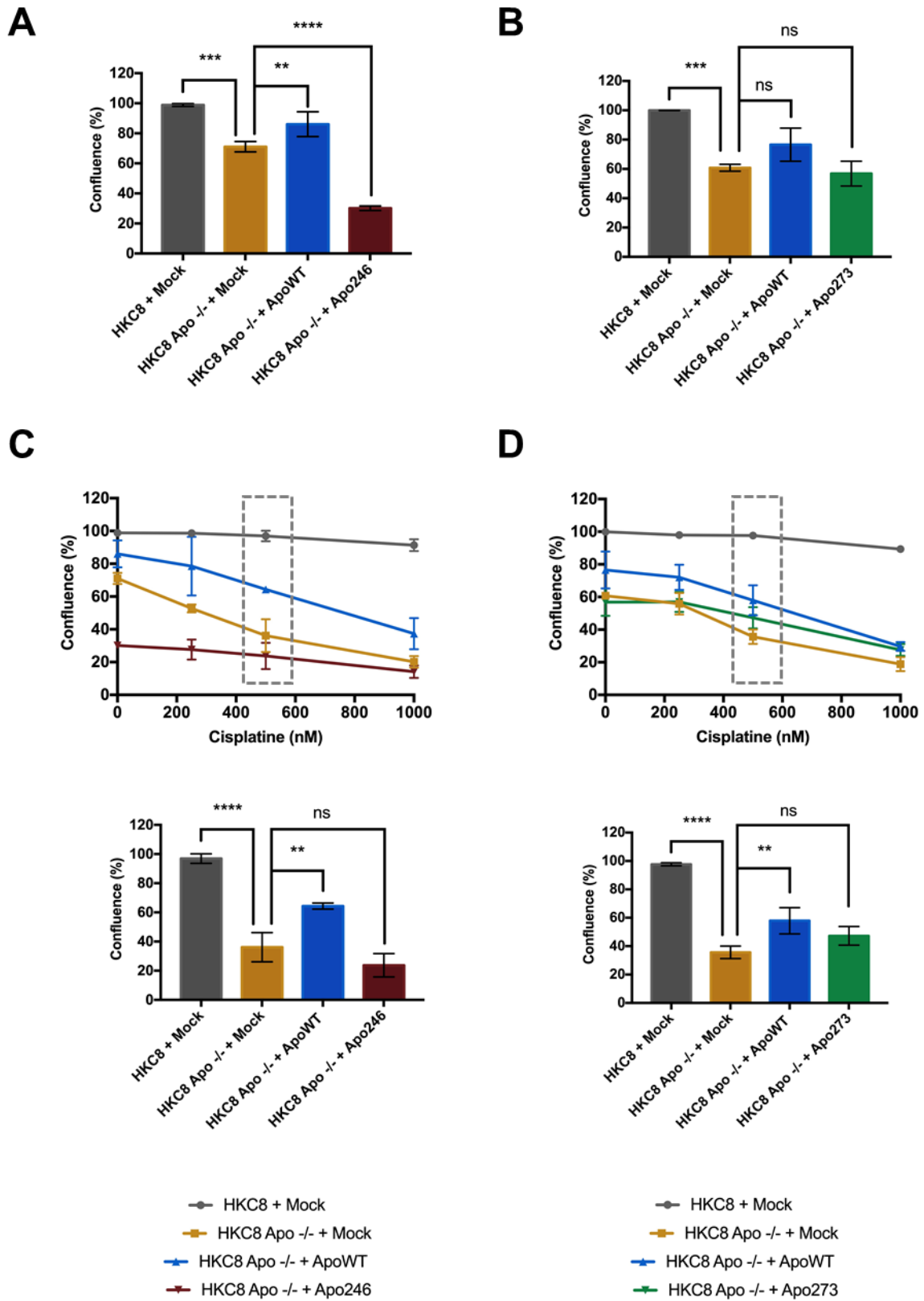


Figure 28 : Etude de l'impact de la surexpression transitoire d'*Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} sur la prolifération et la sensibilité au cisplatine des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-}.

A-B Analyse par l'Incucyte de la prolifération cellulaire évaluée par le pourcentage de confluence après six jours de culture en absence de traitement des cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire avec le vecteur vide (Mock) ou les vecteurs d'expression d'*Apollo*^{WT} (ApoWT), *Apollo*^{N246I} (Apo246) (**A**) ou *Apollo*^{Y273H} (Apo273) (**B**). Les moyennes et écart-types de triplicats biologiques sont représentés. **C-D** Etude de la sensibilité au cisplatine des cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire avec le vecteur vide (Mock) ou les vecteurs d'expression d'*Apollo*^{WT} (ApoWT), *Apollo*^{N246I} (Apo246) (**C**) ou *Apollo*^{Y273H} (Apo273) (**D**). Les histogrammes correspondent à la confluence des cellules traitées avec 500nM de cisplatine. Les moyennes et écart-types de triplicats biologiques sont représentés. Les valeurs statistiques découlent d'une analyse ANOVA univariée par rapport à la condition HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock avec $\alpha=0,05$. ns : non significatif, ** : $p<0,01$ *** : $p<0,001$, **** : $p<0,0001$.

En absence de traitement, les résultats montrent une diminution du pourcentage de confluence des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock par rapport aux cellules HKC8 + Mock (**Figures 28A, 28B**). Bien que la différence soit non significative dans une des deux expériences réalisées, cette diminution semble partiellement compensée en réponse à la transfection transitoire d'*Apollo*^{WT}. A l'inverse, la transfection transitoire d'*Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H} ne permet pas de compenser la diminution du pourcentage de confluence observée dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock. Cette diminution est même accentuée dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Apo246. Il est cependant probable que ce résultat soit la conséquence d'une erreur d'ensemencement de ces cellules. Ces résultats suggèrent une diminution de la prolifération et de la survie à faible densité des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-}, partiellement inhibée par l'expression d'*Apollo*^{WT} mais pas par les formes mutées.

En présence du traitement au cisplatine, les résultats montrent une diminution du pourcentage de confluence des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock par rapport aux cellules HKC8 + Mock qui reflète une augmentation de la sensibilité au cisplatine des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} par rapport aux cellules parentales (**Figures 28C, 28D**). De plus, la diminution du pourcentage de confluence observée en présence de cisplatine dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock est partiellement compensée dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + ApoWT. A l'inverse, les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Apo246 et HKC8 *Apollo*^{-/-} + Apo273 présentent des pourcentages de confluence en présence de cisplatine similaires à celui des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock. Ces résultats suggèrent que la sensibilité au cisplatine observée pour les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} +

Mock résulte en partie de la suppression de l'expression d'*Apollo* et que les formes mutées échouent à réduire cette sensibilité.

Bien que les résultats présentés correspondent à la moyenne de triplicats biologiques, ils demeurent issus d'une seule expérience et doivent donc être reproduits. D'autre part, il sera nécessaire de poursuivre l'optimisation de cette expérience de sensibilité de façon à déterminer si des variations dans les conditions de transfections et/ou temps de traitements permettraient d'observer une restauration complète du phénotype sauvage.

V Etude des voies de signalisation associées aux activités d'Apollo dans les cellules HKC8

La suppression de l'expression d'*Apollo* induit une augmentation du pourcentage de dommages télomériques dans les cellules HKC8, indiquant une diminution de la protection des télomères en absence d'*Apollo* dans cette lignée rénale (**Article Figure 5B**). De plus, la diminution (**Article Figure 2B**) ou la suppression (**Article Figure 3C**) de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 induit une réduction de la prolifération cellulaire. L'ensemble de ces résultats suggère que la seule altération de l'expression d'*Apollo* suffit à développer un stress endogène dans les cellules rénales. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude des voies de signalisation pouvant expliquer ces effets dans les cellules HKC8 en absence de stress exogène additionnel. Dans le même temps, nous avons étudié l'impact de l'expression des formes mutées *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} sur ces voies de signalisation.

1 - Etude par transfections stables

Dans l'article, nous avons montré que la suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 induit une augmentation du nombre de foci 53BP1 et γ H2AX en absence de stress génotoxique induit (**Article Figure 3D**). Or, la formation de ces foci constitue un marqueur de l'activation de la DDR en réponse à des DSBs. La perte d'*Apollo* induit donc la génération et/ou la persistance de DSBs dans les cellules rénales HKC8. Nous avons également montré que la perte d'expression d'*Apollo* induit une augmentation du pourcentage de dommages télomériques dans les cellules HKC8, donc qu'*Apollo* participe à la protection des télomères dans ces cellules (**Article Figure 5B**). Il est donc probable qu'au moins une partie de la DDR associée à la reconnaissance des DSBs dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} soit induite au niveau des télomères présentant un défaut de protection. Dans la littérature, le défaut de protection des télomères associé à la délétion d'*Apollo* dans les MEFs induit l'activation de la voie de signalisation ATM (P. Wu et al., 2010). Nous nous sommes donc intéressés à l'activation de la voie de signalisation ATM dans cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}. Pour ce faire, nous avons quantifié le niveau de phosphorylation d'ATM (p-ATM) et le niveau de phosphorylation de sa cible CHK2 (p-CHK2), par Western blot dans les différentes lignées stables.

Les résultats obtenus montrent qu'en absence de stress génotoxique induit, les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock présentent un niveau de p-ATM supérieur à celui des cellules HKC8 + Mock (**Figure 29**). De manière cohérente, le niveau de p-CHK2 est également supérieur dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock par rapport aux cellules HKC8 + Mock. Dans le Western blot présenté, les niveaux de p-ATM et p-Chk2 dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + ApoWT semblent légèrement inférieurs à celui des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock. Cependant, cette différence n'a pas été retrouvée dans deux autres expériences indépendantes et les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + ApoWT présentent globalement le même niveau de p-ATM et p-CHK2 que les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock. Finalement, les résultats montrent que les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec le vecteur codant *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H} présentent des niveaux de p-ATM et p-Chk2 similaires à ceux des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock. Compte tenu de l'absence de différence entre les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock et les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + ApoWT, il n'est pas possible de conclure que l'activation de la voie ATM est spécifiquement induite par la suppression de l'expression d'*Apollo*. Comme expliqué précédemment, il est possible que cette absence de différence dans les lignées HKC8 *Apollo*^{-/-} stables soit expliquée par le faible niveau de réexpression d'*Apollo* dans ces lignées.

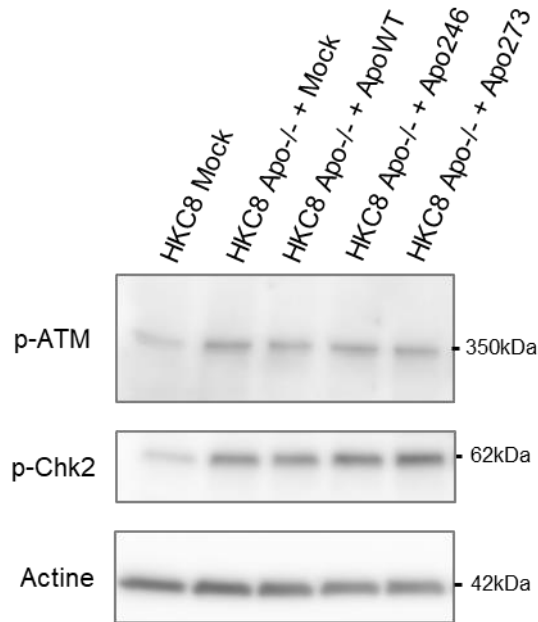


Figure 29 : Etude de l'activation de la voie ATM dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}.

Analyse par Western blot des extraits protéiques de cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec le vecteur vide (Mock) ou les vecteurs d'expression d'*Apollo*^{WT} (ApoWT), *Apollo*^{N246I} (Apo246) ou *Apollo*^{Y273H} (Apo273). Résultat représentatif de trois expériences indépendantes.

En réponse aux stress génotoxiques induits par l'étoposide (DSBs), le cisplatine et la MMC (ICLs), la diminution ou la suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 induit des altérations de l'induction de la voie mitochondriale de l'apoptose analysée par cytométrie en flux (**Figures 24, 26**). D'autre part, l'induction de l'apoptose dans les cellules HKC8 traitées avec ces drogues génotoxiques est dépendante de p53 et des caspases (**Figure 23**). En absence de stress exogènes, la diminution ou la suppression de l'expression d'*Apollo* est associée à une diminution de la prolifération cellulaire, un phénotype pouvant être lié à l'activité antiproliférative de p53 (**Article Figures 2B, 3C**). Finalement, p53 est une cible de la voie ATM, laquelle semble être activée en réponse à la suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 (**Figure 29**). L'ensemble de ces résultats nous a donc conduit à étudier l'activation de la voie de signalisation p53 dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} stables. Pour cela, nous avons quantifié le niveau des ARNm *p53* par RT-qPCR et le niveau de phosphorylation de p53 sur son résidu sérine S15 (p-p53), un marqueur de son activation, par

Western blot dans ces différentes lignées. Nous avons également quantifié le niveau des ARNm *p21* et *NOXA*, deux cibles transcriptionnelles de p53 respectivement impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose.

L'analyse des résultats montre que p-p53 est détecté dans l'ensemble des lignées HKC8 et HKC8 *Apollo*^{-/-} stables ce qui suggère la présence d'un stress endogène dans toutes les cellules, y compris les cellules HKC8 parentales (**Figure 30A**). D'autre part, le niveau des ARNm *p53* et le niveau de p-p53 sont similaires entre les différentes lignées (**Figures 30A, 30B**). Les légères variations du niveau de p-p53 observées dans le Western blot présenté ne sont pas systématiquement retrouvées dans les autres expériences indépendantes. Concernant *NOXA*, les résultats montrent une augmentation de la quantité relative d'ARNm dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock par rapport aux cellules HKC8 + Mock (**Figure 30C**). En revanche, cette quantité est similaire entre les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock et les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec le vecteur codant *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}. Ces résultats ne permettent pas de confirmer que l'augmentation du niveau d'expression de *NOXA* est spécifiquement induite par la perte d'expression d'*Apollo*. Concernant *p21*, les résultats montrent une augmentation significative de la quantité relative d'ARNm dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock par rapport aux cellules HKC8 + Mock (**Figure 30D**). Les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + ApoWT présentent une diminution légère mais significative de cette quantité ce qui suggère que l'augmentation observée dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock est partiellement induite par la suppression de l'expression d'*Apollo*. La diminution de la quantité relative d'ARNm *p21* est également observée dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Apo273 mais pas HKC8 *Apollo*^{-/-} + Apo246. Ainsi, il semble que l'expression d'*Apollo*^{Y273H} mais pas d'*Apollo*^{N246I} permette d'inhiber partiellement l'augmentation du niveau d'expression de *p21*. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la suppression de l'expression d'*Apollo* pourrait induire l'augmentation de l'expression de cibles transcriptionnelles de p53 dont *p21*. Il est possible que la transcription de *NOXA* soit également augmentée en réponse à l'absence d'*Apollo* mais que le faible niveau de réexpression d'*Apollo* dans les lignées stables soit limitant dans l'étude de cette réponse.

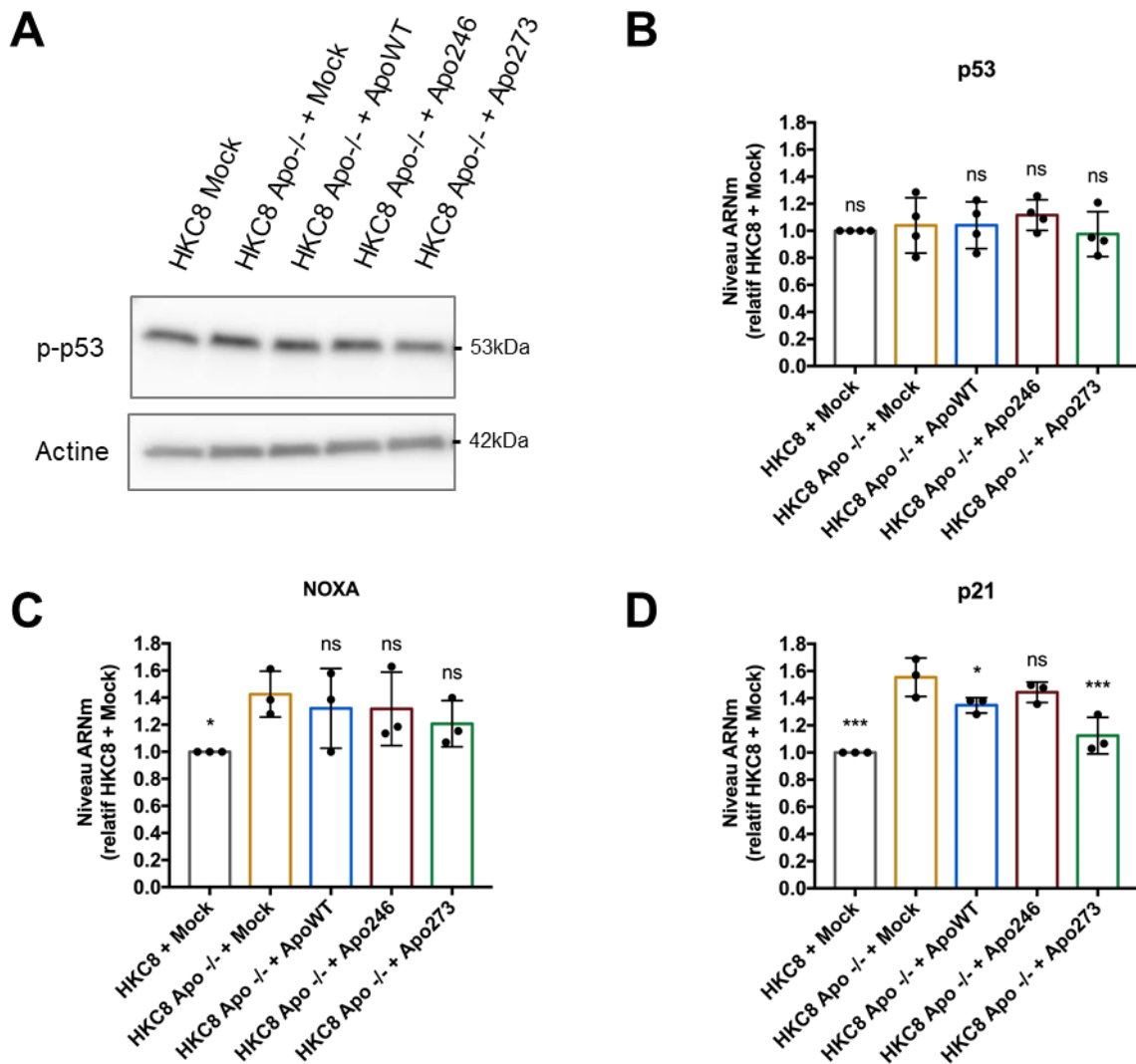


Figure 30 : Analyse de l'activation de la voie p53 dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}.

A Analyse par Western blot des extraits protéiques de cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec le vecteur vide (Mock) ou les vecteurs d'expression d'*Apollo*^{WT} (ApoWT), *Apollo*^{N246I} (Apo246) ou *Apollo*^{Y273H} (Apo273). Résultat représentatif de trois expériences indépendantes. **B-D** Quantifications relatives des ARNm p53 (**B**) NOXA (**C**) et p21 (**D**) dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec le vecteur vide (Mock) ou les vecteurs d'expression d'*Apollo*^{WT} (ApoWT), *Apollo*^{N246I} (Apo246) ou *Apollo*^{Y273H} (Apo273). Les gènes de ménage utilisés sont PPIA et HPRT1. Les moyennes et écart-types de triplicats ou quadruplicats biologiques sont représentés. Les valeurs statistiques découlent d'une analyse ANOVA bivariée par rapport à la condition HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock avec $\alpha=0,05$. ns : non significatif, * : $p<0,05$, *** : $p<0,001$.

L'augmentation de l'activité du facteur de transcription HIF constitue un mécanisme majeur de l'oncogenèse rénale. En effet, de nombreux gènes associés au développement des RCC, particulièrement des ccRCC, présentent un lien direct ou indirect avec la régulation de la stabilité et de l'activité de HIF α (**Figure 3**). Bien qu'aucun lien ne soit actuellement établi entre HIF et Apollo, le fait que les mutations *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} aient été identifiées chez des patients atteints de ccRCC nous a incité à étudier la possibilité de l'existence d'un tel lien. Dans cet objectif, nous avons étudié l'impact du niveau d'expression et du statut mutationnel d'*Apollo* sur le niveau d'expression de *HIF1 α* et *HIF2 α* au niveau transcriptionnel par RT-qPCR dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} stables.

Les résultats montrent que la suppression de l'expression d'*Apollo* n'induit pas de changement significatif de la quantité relative d'ARNm *HIF1 α* (**Figure 31A**). En revanche, la quantité relative d'ARNm *HIF2 α* est multipliée par 3-4 dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock par rapport aux cellules HKC8 + Mock (**Figure 31B**). Cependant, cette quantité est similaire entre les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock et les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec les vecteurs codant *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}. Ces résultats ne permettent donc pas de confirmer que l'augmentation de la quantité relative d'ARNm *HIF2 α* est spécifiquement induite par la perte d'expression d'*Apollo*. Une nouvelle fois, il est possible que le niveau de réexpression des différentes formes d'*Apollo* dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} stables soit trop faible pour observer des différences par rapport aux cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock.

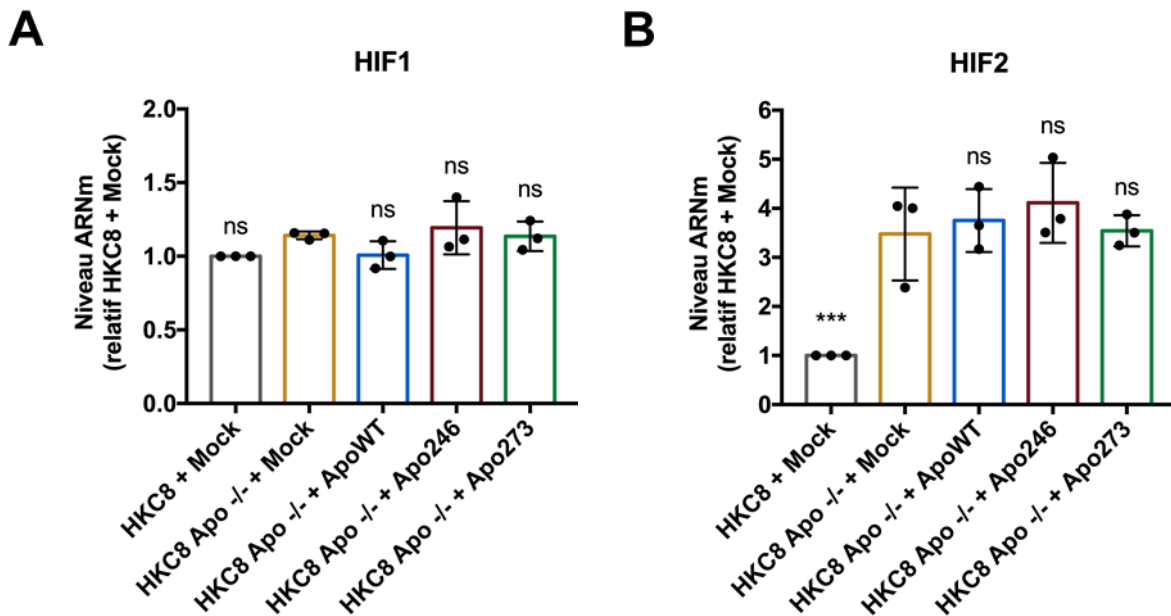


Figure 31 : Etude de l'expression de *HIF1 α* et *HIF2 α* dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}.

A-B Quantifications relatives des ARNm *HIF1 α* (**A**) et *HIF2 α* (**B**) dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec le vecteur vide (Mock) ou les vecteurs d'expression d'*Apollo*^{WT} (ApoWT), *Apollo*^{N246I} (Apo246) ou *Apollo*^{Y273H} (Apo273). Les gènes de ménage utilisés sont *PPIA* et *HPRT1*. Les moyennes et écart-types de triplicats biologiques sont présentés. Les valeurs statistiques découlent d'une analyse ANOVA bivariée avec $\alpha=0,05$. ns : non significatif, *** : $p<0,001$.

2 - Etude par transfections transitoires

Nous avons constaté qu'il était globalement difficile d'associer des différences d'expression transcriptionnelles de certains gènes impliqués dans la DDR ou l'hypoxie avec des niveaux variables d'expression des différentes formes d'*Apollo* dans les cellules HKC8 transfectées de façon stable. En effet, des différences ont généralement été observées entre les cellules HKC8 + Mock et les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock pour les différentes voies de signalisation étudiées. En revanche, les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec les différentes formes d'*Apollo* présentent généralement un profil de réponse identique à celui des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock. Compte tenu du faible niveau d'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 transfectées de façon stable avec *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}, nous avons poursuivi l'étude des différentes voies de signalisation d'intérêt dans des cellules HKC8

transfectées de façon transitoire afin d'obtenir des niveaux d'expression d'*Apollo* et de ses formes mutées plus importants.

L'étude des voies de signalisation dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire est tout juste initiée mais les résultats d'une première série d'expériences sont intéressants. Tout d'abord, les résultats préliminaires montrent que la transfection transitoire des différentes formes d'*Apollo* permet d'obtenir des niveaux d'ARNm très élevés, multipliés par environ 100-150 par rapport aux cellules HKC8 parentales exprimant *Apollo* endogène (**Figure 32A**). Ce résultat est cohérent avec le fait que les transfections transitoires permettent de détecter la protéine *Apollo* en Western blot (**Figure 32B**).

Concernant l'étude de la voie de signalisation dépendante de p53, les résultats de Western blot montrent que le niveau de protéines p-p53 est globalement similaire entre les différentes conditions de transfection transitoire. Une légère augmentation du niveau de p-p53 semble toutefois visible dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock (**Figure 32B**). D'autre part, le niveau de la caspase 3 clivée augmente dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock par rapport aux cellules HKC8 + Mock. Cette augmentation est réduite dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire avec *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}. Ces résultats suggèrent que la suppression de l'expression d'*Apollo* induit une augmentation du clivage de la caspase 3 dans les cellules HKC8 et que l'expression des formes sauvage et mutées d'*Apollo* inhibent cette augmentation. En parallèle, les résultats de RT-qPCR montrent que les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock présentent une augmentation des quantités relatives d'ARNm *NOXA* et *p21* par rapport aux cellules HKC8 + Mock (**Figures 32C, 32D**). Ces augmentations sont réduites dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + ApoWT, suggérant que la réexpression d'*Apollo*^{WT} permet de compenser partiellement l'augmentation des niveaux d'expression de *p21* et *NOXA*. Cette compensation partielle est également présente dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire avec les formes mutées *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H}. Ainsi, les résultats de la première série de transfections transitoires montrent une tendance vers l'augmentation des niveaux d'expression de *NOXA* et *p21* dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock et suggèrent que ces effets sont bien en partie induits par la suppression de l'expression d'*Apollo*. Pour conclure, il semble que la suppression de l'expression d'*Apollo* pourrait induire l'augmentation de

l'expression de cibles transcriptionnelles de p53, dont *p21* et *NOXA*, ainsi que l'activation du clivage de la caspase 3. Cependant, ces expériences doivent être reproduites de façon à vérifier nos premières conclusions.

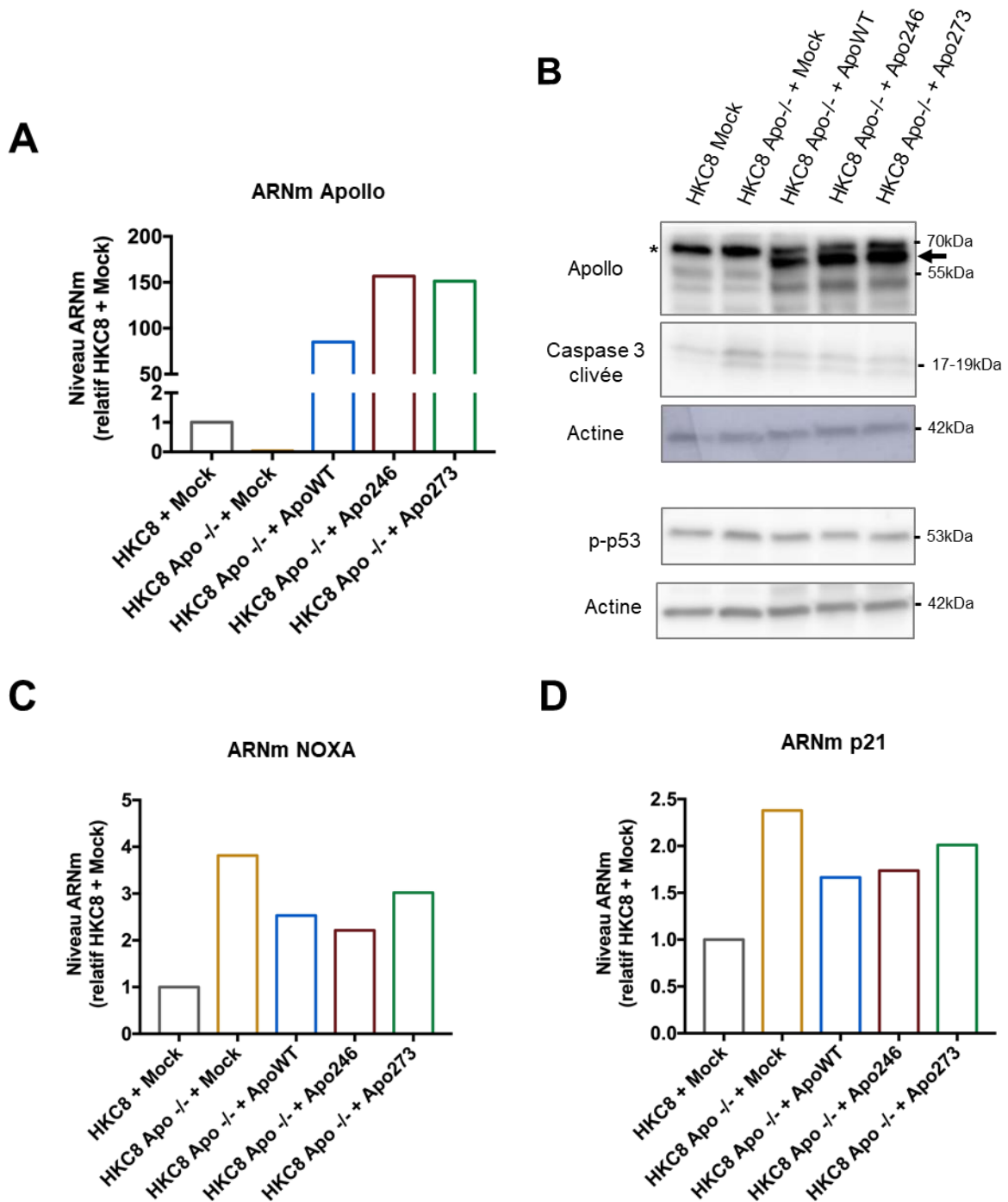


Figure 32 : Etude de l'impact de la surexpression transitoire d'*Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} sur l'activation de la voie de signalisation de p53 dans les cellules HKC8 *Apo*^{-/-}.

A Quantifications relatives des ARNm d'Apollo dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire avec le vecteur vide (Mock) ou les vecteurs d'expression d'*Apollo*^{WT} (ApoWT), *Apollo*^{N246I} (Apo246) ou *Apollo*^{Y273H} (Apo273). Les gènes de ménage utilisés sont PPIA et HPRT1. **B** Analyse par Western blot des extraits protéiques de cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire. *: bande non spécifique. **C-D** Quantifications relatives des ARNm NOXA (**C**) et p21 (**D**) dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire. Les gènes de ménage utilisés sont PPIA et HPRT1.

Indépendamment de la voie p53, nous avons initié l'étude de la voie HIF dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire. Les résultats préliminaires obtenus à partir d'une première série de transfections transitoires montrent que la quantité relative d'ARNm *HIF2α* est augmentée dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock par rapport aux cellules HKC8 + Mock (**Figure 33**). De plus, cette augmentation est réduite dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + ApoWT, suggérant que la réexpression d'*Apollo*^{WT} permet de compenser partiellement l'effet de la suppression de l'expression d'*Apollo* endogène. Les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées avec les formes mutées *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} présentent également une inhibition de l'augmentation de la quantité relative d'ARNm *HIF2α* par rapport aux cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock. En conséquence, l'augmentation de l'expression de *HIF2α* semble être, au moins en partie, spécifiquement associée à la suppression de l'expression d'*Apollo*. Cette expérience doit néanmoins être reproduite de façon à vérifier nos premières conclusions.

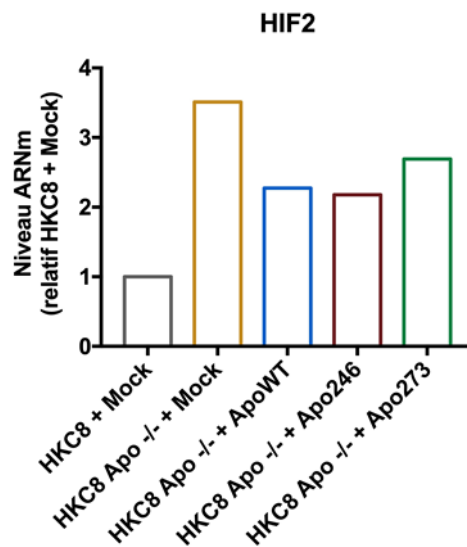


Figure 33 : Etude de l'impact de la surexpression transitoire d'*Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} sur l'expression de *HIF2α* dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-}.

Quantifications relatives des ARNm *HIF2α* dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire avec le vecteur vide (Mock) ou les vecteurs d'expression d'*Apollo*^{WT} (ApoWT), *Apollo*^{N246I} (Apo246) ou *Apollo*^{Y273H} (Apo273). Les gènes de ménage utilisés sont *PPIA* et *HPRT1*.

3 - Etude par diminution de l'expression avec des siARN

Compte tenu des potentielles associations entre l'expression d'*Apollo*, de *NOXA* et de *p21*, nous avons initié l'étude de la relation fonctionnelle entre *Apollo* et *p53*. Pour ce faire, les ARNm *Apollo* et *p53* (ainsi que *NOXA* et *p21*) ont été quantifiés par RT-qPCR dans des cellules HKC8 traitées avec des siARN spécifiques d'*Apollo* ou de *p53* de façon à réduire l'expression de l'un ou l'autre de ces gènes.

L'analyse des résultats montrent une tendance vers la diminution de la quantité relative d'ARNm *p21* et *NOXA* dans les cellules HKC8 siARN *p53* par rapport aux cellules HKC8 transfectées siARN contrôle, un résultat en accord avec le fait que *p53* agit en augmentant le niveau de transcription de ces gènes (**Figures 34A, 34B**). D'autre part, les cellules HKC8 siARN *Apollo* présentent une absence de variation significative de la quantité relative d'ARNm *p21* et *NOXA* par rapport aux cellules HKC8 siARN contrôle. Ces derniers résultats sont différents de ceux obtenus en comparant les cellules HKC8 parentales et les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} (**Figures 30C, 30D, 32C, 32D**). Il est possible que cette variation soit expliquée par la différence d'impact de la diminution partielle et temporaire de l'expression d'*Apollo* par rapport à la suppression

de cette expression à long-terme. Les résultats montrent également que les cellules HKC8 siARN *Apollo* ne présentent pas de variation significative de la quantité relative d'ARNm *p53* par rapport aux cellules HKC8 siARN contrôle (**Figure 34C**). En revanche, les cellules HKC8 siARN *p53* semblent présenter une diminution d'environ 30% de la quantité relative d'ARNm *Apollo* par rapport aux cellules HKC8 siARN contrôle (**Figure 34D**). Ce résultat suggère que l'expression d'*Apollo* pourrait être régulée au niveau transcriptionnel par *p53* et donc qu'*Apollo* pourrait constituer une cible transcriptionnelle de *p53*. Cependant, cette hypothèse doit être étudiée de manière plus approfondie.

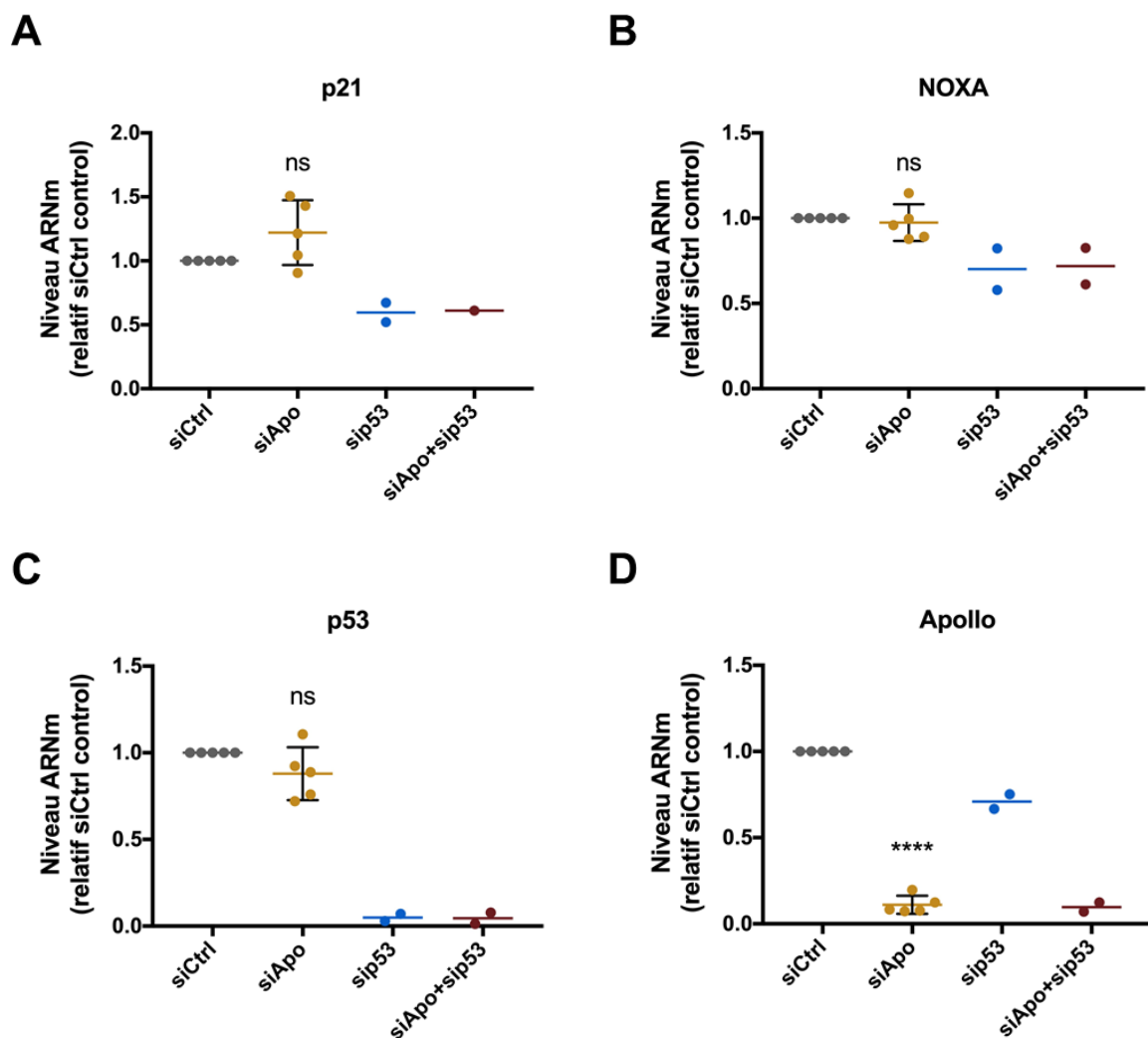


Figure 34 : Etude des co-régulations transcriptionnelles de *p53* et *Apollo* dans les cellules HKC8.

A-D Quantifications relatives des ARNm *p21* (**A**), *NOXA* (**B**), *p53* (**C**) et *Apollo* (**D**) dans les cellules HKC8 parentales transfectées avec des siARN spécifiques d'*Apollo* (siApo), des siARN spécifiques de *p53* (sip53), une combinaison de siApo et sip53 (siApo+sip53) ou des siARN

contrôles (siCtrl). Les gènes de ménage utilisés sont PPIA et HPRT1. Les moyennes et écart-types de deux ou cinq répliquats biologiques sont présentés. L'analyse statistique a été réalisée uniquement sur les conditions siCtrl et siApo (n=5). Les valeurs statistiques découlent d'un test de Student bilatéral par rapport aux cellules transfectées avec siCtrl avec $\alpha=0,05$. ns : non significatif, **** : $p<0,0001$.

Compte tenu de l'augmentation de la quantité relative d'ARNm *HIF2 α* dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} par rapport aux cellules HKC8 parentales, nous nous sommes également intéressé à l'étude de l'expression de *HIF1 α* et *HIF2 α* dans les cellules HKC8 transfectées avec des siARN *Apollo*. Contrairement à l'effet non significatif observé en réponse à la suppression de l'expression d'*Apollo*, la quantité relative de transcrits de *HIF1 α* diminue dans les cellules HKC8 siARN *Apollo* (**Figure 35A**). De plus, à l'inverse de l'augmentation observée dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-}, la quantité relative d'ARNm *HIF2 α* est diminuée d'environ 50% dans les cellules HKC8 siARN *Apollo* par rapport aux cellules HKC8 siARN contrôle (**Figure 35B**). Ces résultats suggèrent que la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit une diminution du niveau d'expression de *HIF1 α* et *HIF2 α* . Cependant, de façon surprenante, il semble que la diminution temporaire (en présence de siARN) et la suppression définitive de l'expression d'*Apollo* (par CRISPR Cas9) aient des effets opposés sur le niveau d'expression de *HIF2 α* .

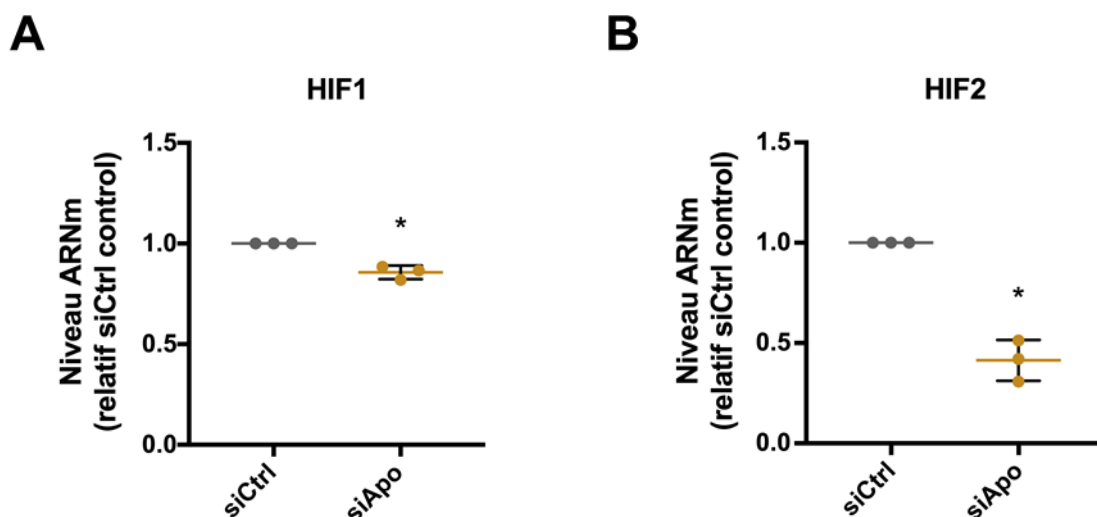


Figure 35 : Etude de l'expression de *HIF1 α* et *HIF2 α* en fonction de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8.

A-B Quantifications relatives des ARNm *HIF1 α* (**A**) et *HIF2 α* (**B**) dans les cellules HKC8 parentales transfectées avec des siARN spécifiques d'*Apollo* (siApo), des siARN spécifiques de p53

*(sip53), une combinaison de siApo et sip53 (siApo+sip53) ou des siARN contrôle (siCtrl). Les gènes de ménage utilisés sont PPIA et HPRT1. Les moyennes et écart-types de triplicats biologiques sont présentés. Les valeurs statistiques découlent d'un test de Student bilatéral avec $\alpha=0,05$. ns : non significatif, * : $p<0,05$.*

VI Etude des interactions protéiques d'Apollo^{WT}, Apollo^{N246I} et Apollo^{Y273H} dans les cellules HKC8

Comme détaillé dans l'introduction, Apollo peut interagir avec TRF2, une protéine participant à la protection des télomères, dans différents modèles cellulaires. D'autres études rapportent des interactions entre Apollo et des protéines impliquées dans la DDR (ex : MUS81, FANCD2) ou le cycle cellulaire (ex : astrine) (revue de (Schmiester & Demuth, 2017)). Enfin, il a été montré qu'Apollo peut former des homodimères dans les cellules HEK293T (van Overbeek & de Lange, 2006). Cependant, aucune étude ne s'était jusqu'à présent focalisée sur l'identification des partenaires d'Apollo dans un modèle de cellules rénales épithéliales. Cette étude a donc été initiée dans le modèle cellulaire HKC8 au cours de ma thèse. Nous souhaitons déterminer si les partenaires d'Apollo décrits dans d'autres modèles cellulaires étaient retrouvés dans le contexte de cellules rénales épithéliales et s'il était possible d'identifier de nouveaux partenaires. Le deuxième objectif de cette étude était de caractériser l'impact des mutations N246I et Y273H d'Apollo sur ses interactions avec ses partenaires protéiques. Pour finir, le dernier objectif consistait à étudier la capacité d'homodimérisation d'Apollo dans les cellules HKC8 et à caractériser l'impact des mutations sur cette potentielle homodimérisation.

1 - Identification des partenaires potentiels d'Apollo^{WT}, Apollo^{N246I} et Apollo^{Y273H}

Afin d'étudier les interactions protéiques d'Apollo de manière globale, une analyse par spectrométrie de masse a initialement été réalisée dans les cellules HKC8. Pour ce faire, les cellules ont été transfectées de façon transitoire avec un vecteur d'expression d'Apollo^{WT}, Apollo^{N246I} ou Apollo^{Y273H} fusionné à un tag Myc à l'extrémité C-terminale ou avec le vecteur vide de façon à exclure les protéines interagissant avec le tag Myc. Les cellules HKC8 ont également été transfectées avec un vecteur d'expression d'Apollo^{WT} fusionné à un tag Flag à l'extrémité N-terminale ou le même vecteur vide (vecteurs fournis par Dr Patrick Revy). Dans l'objectif d'étudier l'impact d'un stress génotoxique sur les interactions protéiques d'Apollo, des cellules HKC8 ont été traitées avec du cisplatine à 25µM pendant 16h après 24h de transfection. Les extraits cellulaires ont ensuite été immunoprécipités avec un anticorps anti-Myc ou anti-Flag de façon à collecter des fractions protéiques enrichies avec les protéines

Apollo exogènes et les éventuelles protéines partenaires. Ces fractions ont ensuite été concentrées par précipitation avec de l'acide trichloroacétique et analysées par spectrométrie de masse (plateforme Taplin Biological Mass Spectrometry Facility, Harvard Medical School, Boston, USA). Trois expériences indépendantes ont été réalisées, chacune incluant des conditions communes et variables (**Figure 36**). Les potentiels partenaires protéiques d'intérêt d'Apollo identifiés sont présentés (**Tableau 2**).

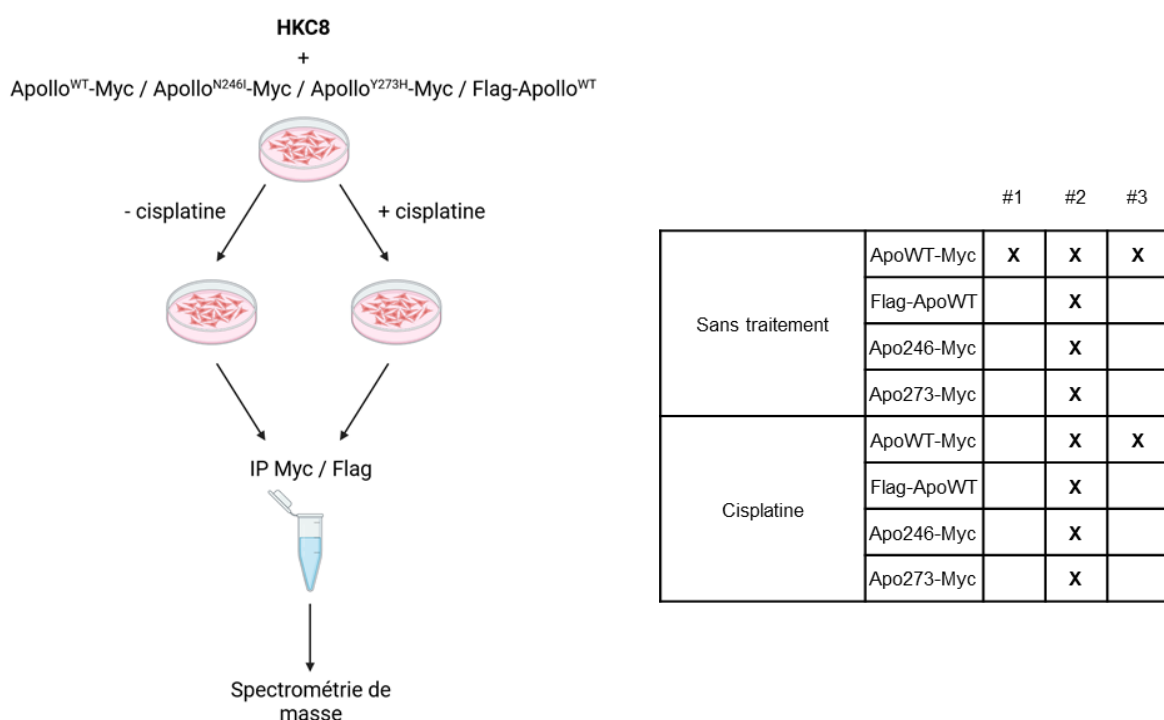


Figure 36 : Détail des différentes conditions expérimentales analysées par spectrométrie de masse.

Représentation schématique des étapes du protocole de génération des échantillons soumis à l'analyse par spectrométrie de masse (gauche) et des conditions incluses dans chacune des trois expériences indépendantes réalisées (droite). Les cellules HKC8 ont été transfectées avec les vecteurs d'expression d'Apollo^{WT}-Myc, Apollo^{N246I}-Myc, Apollo^{Y273H}-Myc ou Flag-Apollo^{WT}. Les vecteurs d'expression vides ont également été transfectés comme contrôles négatifs afin d'exclure les protéines co-immunoprécipitées de façon non spécifique (non représentés). Les cellules HKC8 transfectées ont été cultivées en absence ou en présence de cisplatine à 25µM pendant 16h. Les extraits protéiques ont été immunoprécipités par un anticorps anti-Myc ou anti-Flag et analysés par spectrométrie de masse.

Gène	Protéine	Sans traitement						Cisplatine				
		ApoWT-Myc			Flag-ApoWT	Apo246-Myc	Apo273-Myc	ApoWT-Myc		Flag-ApoWT	Apo246-Myc	Apo273-Myc
		#1	#2	#3	#2	#2	#2	#2	#3	#2	#2	#2
<i>DCLRE1B</i>	Apollo	13/16	9/17	19/22	28/144	10/26	9/16	6/10	15/19	26/125	12/24	13/27
<i>TERF2</i>	TRF2	12/13	9/16	5/5	11/15	7/9	4/6	7/12	6/6	18/67	7/11	6/12
<i>TERF2IP</i>	Rap1	10/13	8/15	7/7	9/19	8/12	5/8	8/15	4/4	17/38	10/13	9/13
<i>SPAG5</i>	Astrine	0	0	0	1/2	1/1	1/1	0	0	1/1	0	0
<i>HSP4L</i>	HSP4L	1/1	0	1/1	0	0	1/1	0	0	3/4	2/2	0
<i>HSPA14</i>	HSPA14	0	0	0	0	1/1	1/2	0	0	0	0	0
<i>DNAJB4</i>	DNAJB4	0	0	0	3/5	0	2/2	0	0	6/9	0	1/1
<i>DNAJB8</i>	DNAJB8	1/1	1/1	0	0	0	0	0	0	1/1	0	0
<i>DNAJC7</i>	DNAJC7	0	0	0	0	0	1/1	0	0	4/5	0	0
<i>DNAJA3</i>	DNAJA3	0	0	0	1/2	1/1	2/2	0	0	0	0	0
<i>TUBB3</i>	TUBB3	1/1	0	0	0	1/3	1/2	0	0	3/3	1/2	0
<i>ARID1A</i>	ARID1A	0	0	0	0	3/4	4/6	0	0	0	3/3	3/5
<i>SDHA</i>	SDHA	0	0	0	1/2	2/3	3/3	0	0	0	2/2	1/2
<i>FEN1</i>	FEN1	0	0	0	1/1	1/2	2/2	0	0	0	1/2	1/1
<i>TP53</i>	p53	1/2	0	1/1	1/1	0	1/3	0	0	0	1/1	0

Tableau 2 : Liste de potentiels partenaires protéiques d'Apollo^{WT}, Apollo^{N256I} ou Apollo^{Y273H} identifiés par spectrométrie de masse.

Quantification du nombre de peptides identifiés par spectrométrie de masse suite à la co-immunoprécipitation d'Apollo^{WT}-Myc, Flag-Apollo^{WT}, Apollo^{N246I}-Myc ou Apollo^{Y273H}-Myc avec un anticorps anti-Myc ou anti-Flag à partir d'extraits protéiques de cellules HKC8 non traitées ou traitées avec du cisplatine à 25µM pendant 16h. Les protéines dont des peptides ont été détectés suite à la co-immunoprécipitation des vecteurs Myc ou Flag vides ont été exclues de l'analyse. Le nombre de peptides uniques (peptide dont la séquence est spécifique d'une protéine unique) et le nombre de peptides totaux (peptide dont la séquence est commune à la protéine identifiée et à d'autres protéines) sont indiqués pour chaque protéine. Nb/nb : nombre de peptides uniques / nombre de peptides totaux. # : numéro de l'expérience parmi les trois expériences indépendantes réalisées. Jaune : protéines connues pour interagir avec Apollo et impliquées dans le maintien des télomères. Vert : protéines connues pour interagir avec Apollo (vert foncé) ou associées à une famille de protéines connues pour interagir avec Apollo (vert clair). Bleu : protéines d'intérêt non connues pour interagir avec Apollo.

1.1 Etude des partenaires connus d'Apollo

1.1.1 Les protéines du complexe shelterin : TRF2 et Rap1

Parmi les partenaires potentiels d'Apollo identifiés par spectrométrie de masse, de nombreux peptides correspondant aux protéines du shelterin TRF2 et Rap1 ont été identifiés dans les fractions co-immunoprécipitées avec Apollo^{WT}-Myc, Flag-Apollo^{WT}, Apollo^{N246I}-Myc ou Apollo^{Y273H}-Myc avec ou sans traitement au cisplatine (**Tableau 2**).

Les ratios du nombre de peptides uniques de TRF2 par rapport au nombre de peptides uniques d'Apollo suite à l'immunoprécipitation des mutants Apollo^{N246I}-Myc et Apollo^{Y273H}-Myc sont inférieurs à celui obtenu suite à l'immunoprécipitation d'Apollo^{WT}-Myc en absence et en présence de cisplatine (**Tableau 3**). Ces résultats montrent que TRF2 interagit avec Apollo^{WT}, Apollo^{N246I} et Apollo^{Y273H} dans les cellules HKC8 et que cette interaction semble négativement impactée par les mutations d'Apollo en absence ou en présence de stress génotoxique. L'interaction entre Apollo^{WT}-Myc, Apollo^{N246I}-Myc ou Apollo^{Y273H}-Myc et TRF2 est également observée par Western blot après co-immunoprécipitation, ce qui confirme la présence de cette interaction dans les cellules HKC8. En revanche, bien qu'une expérience de Western blot ait permis d'observer une réduction de l'interaction entre Apollo^{N246I}-Myc ou Apollo^{Y273H}-Myc et TRF2, deux autres expériences n'ont pas permis de reproduire ce résultat. Dans l'ensemble, les expériences de Western blot n'ont pas mis en évidence d'impact négatif des mutations N246I et Y273H sur l'interaction entre Apollo et TRF2 (**Article Figure 4**).

Comparaison	Ratio TRF2 / Apollo	
	Sans traitement	Cisplatine
ApoWT-Myc / ApoWT-Myc	1	1
Apo246-Myc / ApoWT-Myc	0,70	0,50
Apo273-Myc / ApoWT-Myc	0,44	0,40

Tableau 3 : Comparaison de la quantité de peptides de TRF2 co-immunoprécipitée avec Apollo^{N246I} ou Apollo^{Y273H} par rapport à Apollo^{WT} par spectrométrie de masse.

Les ratios correspondent au rapport entre le nombre de peptides uniques de TRF2 et le nombre de peptides uniques d'Apollo identifiés par spectrométrie de masse avec Apollo^{N246I} ou Apollo^{Y273H} par rapport à Apollo^{WT}. Les calculs sont obtenus à partir des résultats de l'expérience #2 dans le **Tableau 2** en absence et en présence de cisplatine.

D'autre part, le ratio du nombre de peptides uniques de TRF2 par rapport au nombre de peptides uniques d'Apollo en présence de cisplatine est supérieur au ratio en absence de traitement pour Apollo^{WT}-Myc et Flag-Apollo^{WT} (**Tableau 4**). La tendance inverse est observée pour Apollo^{N246I}-Myc et Apollo^{Y273H}-Myc. Ces résultats suggèrent que l'exposition au cisplatine pourrait favoriser l'interaction entre Apollo^{WT} et TRF2 mais inhiberait l'interaction entre Apollo^{N246I} ou Apollo^{Y273H} et TRF2. Le manque de temps ne nous a pas permis de vérifier ces résultats par Western blot. Néanmoins, il est possible que l'exposition à un agent génotoxique tel que le cisplatine induise une augmentation de l'interaction entre Apollo et TRF2 et puisse mettre en évidence un impact des mutants sur cette interaction de façon plus visible qu'en absence de traitement.

Comparaison	Ratio TRF2 / Apollo				
	ApoWT-Myc		Flag-ApoWT	Apo246-Myc	Apo273-Myc
	#2	#3	#2	#2	#2
Cisplatine / Sans traitement	1,17	1,52	1,76	0,58	0,46

Tableau 4 : Comparaison de la quantité de peptides de TRF2 co-immunoprécipitée avec Apollo^{WT}, Apollo^{N246I} ou Apollo^{Y273H} en présence de cisplatine par rapport à en absence de traitement par spectrométrie de masse.

*Les ratios correspondent au rapport entre le nombre de peptides uniques de TRF2 et le nombre de peptides uniques d'Apollo identifiés par spectrométrie de masse avec Apollo^{WT}, Apollo^{N246I} ou Apollo^{Y273H} en présence de cisplatine par rapport à en absence de traitement. Les calculs sont obtenus à partir des résultats des expériences #2 et #3 dans le **Tableau 2**.*

Enfin, Rap1 étant une protéine partenaire de TRF2, nous avons supposé que son interaction avec Apollo était probablement indirecte. L'étude de cette interaction n'a donc pas été approfondie.

1.1.2 Les autres protéines partenaires connues d'Apollo

L'astrine est une protéine impliquée dans la progression du cycle cellulaire au cours de la mitose et précédemment décrite comme capable d'interagir avec Apollo dans les cellules HEK293T (L. Liu et al., 2009). Dans cette étude, entre 1 et 2 peptides correspondant à la protéine astrine ont été identifiés dans les fractions co-immunoprécipitées avec Flag-Apollo^{WT}, Apollo^{N246I}-Myc ou Apollo^{Y273H}-Myc (**Tableau 2**). Ces résultats suggèrent que l'astrine pourrait

interagir avec les formes Apollo sauvage et mutées dans les cellules HKC8. Cependant, nous avons jusqu'à présent échoué à détecter l'astrine dans les fractions co-immunoprécipitées avec les différentes formes d'Apollo par Western blot. L'étude de la potentielle interaction entre l'astrine et Apollo dans les cellules HKC8 doit donc être poursuivie.

Une précédente étude a montré que les protéines HSC70 et HSP72 membres de la famille des protéines HSP70 peuvent interagir avec Apollo dans les cellules HEK293T (Anders et al., 2009). Dans cette même étude, la tubuline beta 2 est également suggérée être une protéine partenaire d'Apollo en raison de son identification dans les extraits co-immunoprécipités avec Apollo par spectrométrie de masse (Anders et al., 2009). Dans notre étude, des peptides correspondant aux protéines HSP4L et HSPA14 ont été identifiés dans les fractions co-immunoprécipitées avec les formes Apollo sauvage ou mutées (**Tableau 2**). Bien que différentes de HSC70 et HSP72, les protéines HSP4L et HSPA14 appartiennent également à la famille des protéines HSP70. D'autre part, notre étude a montré la présence de peptides correspondant aux protéines DNAJA3, DNAJB4, DNAJB8 et DNAJC7, membres de la famille des protéines HSP40 (Heat Shock Protein 40) dans les fractions co-immunoprécipitées avec les formes d'Apollo sauvage ou mutées (**Tableau 2**). L'ensemble de ces résultats suggère qu'Apollo pourrait interagir avec différentes protéines heat shock dans les cellules HKC8. Finalement, des peptides correspondant à la tubuline beta 3 (Tubulin Beta 3 Class III, TUBB3) ont été identifiés dans les fractions co-immunoprécipitées avec les formes Apollo sauvage ou mutées (**Tableau 2**). Nos résultats associés à ceux de l'équipe d'Ilja Demuth suggèrent que plusieurs membres de la famille des tubulines beta pourraient interagir avec Apollo.

Dans l'ensemble, il est possible que, dans les cellules HKC8, Apollo soit capable d'interagir avec différentes protéines précédemment montrées comme des partenaires protéiques dans d'autres modèles cellulaires. Cependant, nos résultats concernant l'astrine, les protéines heat shock et la tubuline beta 3 sont préliminaires et l'étude de leur possible interaction avec Apollo doit être poursuivie.

1.2 Etude des partenaires potentiels d'Apollo

Hormis les partenaires d'Apollo décrits dans de précédentes études, nous avons pu identifier de nombreuses autres protéines susceptibles d'interagir avec Apollo dans les différentes expériences de spectrométrie de masse. A partir de ces résultats et des données disponibles dans la littérature, nous avons sélectionné des protéines candidates potentiellement intéressantes pour l'étude de l'activité d'Apollo et de ses mutants.

1.2.1 ARID1A

La protéine ARID1A (AT-Rich Interaction Domain 1A) ou BAF250a, est une sous-unité des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF, nommée d'après son domaine ARID de liaison non-spécifique à l'ADN. Les complexes SWI/SNF sont divisés en deux classes : les complexes BAF (Brahma Associated Factor) et les complexes PBAF (Polybromo-associated BAF) caractérisés par la présence de PBRM1. ARID1A est retrouvé dans les complexes BAF (Mathur, 2018; Mullen et al., 2021). De manière intéressante, *ARID1A* est un des gènes les plus fréquemment mutés dans les ccRCC (Linehan & Ricketts, 2019; Turajlic et al., 2018).

Aucun peptide associé à la protéine ARID1A n'a été identifié dans les fractions protéiques co-immunoprécipitées avec Apollo^{WT}-Myc et Flag-Apollo^{WT}. A l'inverse entre 3-4 peptides uniques d'ARID1A ont été identifiés dans les fractions co-immunoprécipitées avec Apollo^{N246I}-Myc et Apollo^{Y273H}-Myc (**Tableau 2**). Ces résultats suggèrent que les mutants Apollo^{N246I} et Apollo^{Y273H} peuvent interagir avec ARID1A contrairement à la forme sauvage d'Apollo. Cependant, nos tentatives de détection d'ARID1A par Western blot dans les fractions co-immunoprécipitées ont pour l'instant été infructueuses (**Figure 37**). Il est toutefois possible que l'absence de détection d'ARID1A dans les fractions co-immunoprécipitées par Western blot soit due à la limite de détection de cette technique, moins sensible que la spectrométrie de masse.

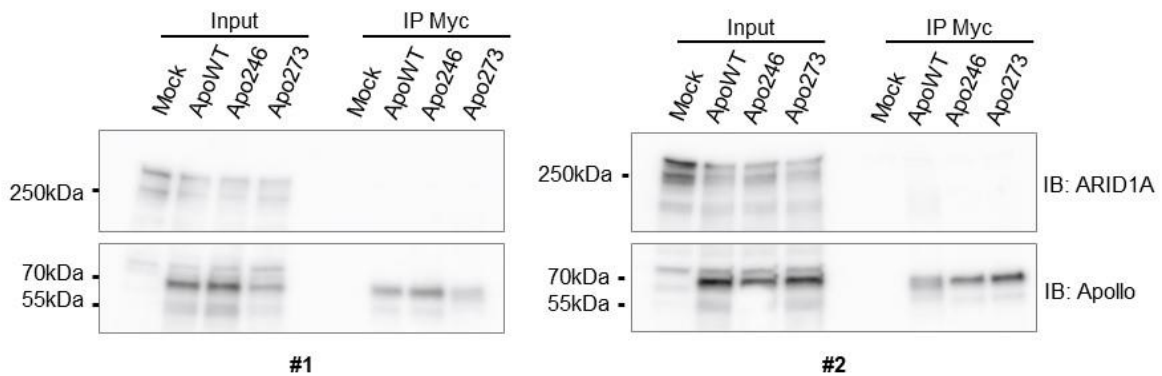


Figure 37 : Etude de l'interaction entre Apollo et ARID1A dans les cellules HKC8 par Western blot.

Analyse par Western blot des extraits protéiques co-immunoprécipités avec les différentes formes exogènes d'Apollo-Myc dans les cellules HKC8 parentales. Les inputs représentent 2% des extraits cellulaires totaux utilisés pour les immunoprécipitations. Mock : vecteur vide, ApoWT : Apollo^{WT}-Myc, Apo246 : Apollo^{N246I}-Myc, Apo273 : Apollo^{Y273H}-Myc.

Par contre, ARID1A est détectée dans les extraits cellulaires totaux par Western blot et les résultats montrent que son niveau protéique tend à diminuer dans les fractions des cellules HKC8 transfectées avec les différentes formes d'Apollo par rapport aux cellules HKC8 transfectées avec le vecteur vide (**Figure 37**). Il semble donc que la surexpression d'Apollo^{WT}, Apollo^{N246I} ou Apollo^{Y273H} soit associée à une diminution du niveau d'ARID1A. Cette étude doit cependant être poursuivie aux niveaux protéique et transcriptionnel avec davantage de réplicats biologiques. En cas de confirmation de l'existence d'une régulation liant Apollo et ARID1A, il sera ensuite nécessaire d'étudier l'origine de ce mécanisme.

1.2.2 SDHA

La protéine SDHA (Succinate Dehydrogenase A) fait partie de la famille des enzymes SDH incluant SDHA, SDHB, SDHC et SDHD. Ces quatre protéines forment un complexe qui catalysent la conversion du succinate en fumarate au cours du cycle de Krebs. Les mutations des gènes *SDHB*, *SDHC* et *SDHD* sont reconnues être à l'origine du syndrome familial associé à un défaut des enzymes SDH qui constitue une forme de syndrome héréditaire de prédisposition au RCC (Hasumi & Yao, 2018; Linehan et al., 2019). Bien que minoritaires, au moins trois cas de RCC associés à des mutations du gène *SDHA* sont rapportés dans la littérature (McEvoy et al., 2018; Ozluk et al., 2015; Yakirevich et al., 2015). De plus, une étude

de séquençage récente montre une association entre des variants du gène *SDHA* et 11 tumeurs de RCC parmi 129 analysées (Kamai et al., 2021).

Dans notre étude, entre 1 et 3 peptides correspondant à la protéine *SDHA* ont été identifiés dans les fractions co-immunoprécipitées avec Flag-Apollo^{WT}, Apollo^{N246I}-Myc ou Apollo^{Y273H}-Myc (**Tableau 2**). Ce résultat suggère que *SDHA* pourrait interagir avec Apollo dans les cellules HKC8. Cependant, ces résultats sont préliminaires et l'étude de la possible interaction entre *SDHA* et Apollo doit être poursuivie par Western blot.

1.2.3 p53

La protéine p53 a été identifiée dans les fractions protéiques co-immunoprécipitées avec Apollo^{WT}-Myc, Flag-Apollo^{WT}, Apollo^{Y273H}-Myc ou Apollo^{Y273H}-Myc dans au moins une des expériences de spectrométrie de masse, ce qui suggère que p53 pourrait être un partenaire protéique d'Apollo (**Tableau 2**). Cependant, nous avons jusqu'ici échoué à détecter p53 par Western blot suite à l'immunoprécipitation d'Apollo^{WT}-Myc (résultats non présentés). Nous n'avons donc pas pu confirmer l'existence d'une interaction entre Apollo et p53 dans les cellules HKC8. De manière similaire à *ARID1A*, il est possible que cette absence de détection de p53 après immunoprécipitation d'Apollo soit la conséquence de la limite de détection du Western blot.

1.2.4 FEN1

La protéine FEN1 (Flap Endonuclease 1) est une endonucléase spécifique des structures « flap », c'est-à-dire des régions d'ADN simple brin protubérantes au sein d'un ADN double brin. Parmi ses différentes fonctions, FEN1 joue notamment un rôle dans le maintien de la stabilité télomérique en participant à la résolution du stress répliatif des télomères (Saharia et al., 2008, 2010; Teasley et al., 2015). D'autre part, FEN1 interagit avec la télomérase et participe à la régulation de son activité (Sampathi et al., 2009).

Dans notre étude, entre 1 et 2 peptides correspondant à la protéine FEN1 ont été identifiés dans les fractions co-immunoprécipitées avec Flag-Apollo^{WT}, Apollo^{Y273H}-Myc ou Apollo^{Y273H}-Myc (**Tableau 2**). Ce résultat suggère que FEN1 pourrait interagir avec Apollo dans les cellules HKC8. Cependant, ces résultats sont préliminaires et l'étude de la possible interaction entre FEN1 et Apollo doit être poursuivie par Western blot.

2 - Etude de l'homodimérisation d'Apollo

L'étude de l'homodimérisation d'Apollo, précédemment identifiée dans les cellules HEK293T par l'équipe de Titia de Lange (van Overbeek & de Lange, 2006), a également été initiée dans les cellules HKC8. Nous souhaitons ainsi vérifier l'existence de la dimérisation d'Apollo dans notre modèle. Par ailleurs, les mutations N246I et Y273H étant présentes à l'état hétérozygote chez les patients atteints de ccRCC, une de nos hypothèses pour expliquer leur impact fonctionnel était qu'elles pouvaient exercer un effet dominant négatif sur la forme sauvage d'Apollo. Dans le cadre de cette hypothèse, nous souhaitons donc étudier l'impact possible des mutations sur cette homodimérisation.

Les cellules HKC8 ont été co-transfectées avec les vecteurs d'expression Flag-Apollo^{WT} et Apollo^{WT}-Myc (ou Apollo^{N246I}-Myc ou Apollo^{Y273H}-Myc). En guise de contrôle, les cellules HKC8 ont également été transfectées avec les vecteurs vides correspondants. Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-Flag puis analysés par Western blot avec un anticorps anti-Myc.

L'analyse des résultats de cette étude montre que les différentes formes d'Apollo-Myc sauvage ou mutées sont détectées dans les fractions protéiques immunoprécipitées avec l'anticorps anti-Flag (**Figure 38**). Ainsi, nos résultats montrent qu'Apollo^{WT} est capable de s'homodimériser dans les cellules HKC8 et que l'hétérodimérisation Apollo^{WT}/Apollo^{N246I} ou Apollo^{WT}/Apollo^{Y273H} est détectée dans ces cellules. De plus, la quantité de protéine Apollo sauvage ou mutée dans les différentes fractions immunoprécipitées semble proportionnelle à la quantité de protéine Apollo dans les extraits protéiques totaux, suggérant que les mutants Apollo^{N246I} et Apollo^{Y273H} conservent le même potentiel d'interaction avec Apollo^{WT} que la forme sauvage. Les mutations ne semblent donc pas altérer la dimérisation d'Apollo. Il est à noter que nous avons eu des problèmes d'hétérogénéité dans la qualité des anticorps anti-Myc d'un lot à l'autre et donc des difficultés à reproduire ces expériences. Néanmoins, nos premiers résultats suggèrent qu'un défaut de dimérisation d'Apollo ne constitue pas un mécanisme à l'origine de l'impact fonctionnel des mutations N246I et Y273H.

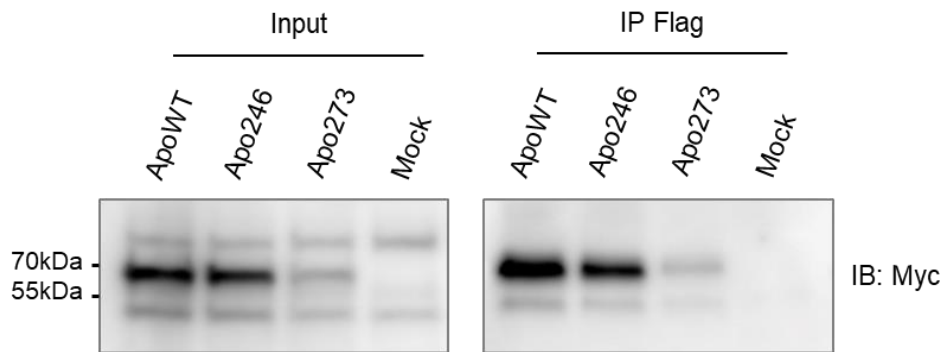


Figure 38 : Etude de l'homodimérisation d'Apollo et de l'impact des mutations sur cette interaction dans les cellules HKC8 par Western blot.

Analyse par Western blot des extraits protéiques co-immunoprécipités avec Flag-Apollo^{WT} dans les cellules HKC8 parentales co-transfectées avec Flag-Apollo^{WT} et les différentes formes d'Apollo-Myc. Les inputs représentent 2% des extraits cellulaires totaux utilisés pour les immunoprécipitations. Mock : vecteur vide, ApoWT : Apollo^{WT}-Myc, Apo246 : Apollo^{N246I}-Myc, Apo273 : Apollo^{Y273H}-Myc.

Discussion

La recherche de nouveaux gènes de prédisposition au RCC a conduit notre équipe de recherche à l'identification de deux variants potentiellement délétères (c.737A>T, p.Asn246Ile noté N246I et c.817T>C, p.Tyr273His noté Y273H) dans le gène *DCLRE1B/Apollo* chez des patients atteints de ccRCC héréditaires. Les activités du gène *DCLRE1B/Apollo* ont été étudiées dans divers modèles cellulaires, majoritairement dans des lignées humaines et murines. Néanmoins, ses activités n'avaient jamais été étudiées dans un modèle de cellules rénales humaines. Au cours de mon projet de thèse, je me suis donc focalisé sur l'étude fonctionnelle d'*Apollo* dans la lignée cellulaire rénale épithéliale humaine HKC8. En parallèle, j'ai cherché à déterminer l'impact potentiel des variants N246I et Y273H sur les activités d'*Apollo* caractérisées dans la lignée HKC8.

I. Etude fonctionnelle d'*Apollo* dans le maintien des télomères des cellules rénales

1 - Le rôle d'*Apollo* dans la protection des télomères des cellules rénales

L'une des activités les mieux décrites et les plus consensuelles d'*Apollo* concerne son rôle dans le maintien des télomères en association avec le complexe shelterin (Schmiester & Demuth, 2017). En effet, la diminution ou la perte d'expression d'*Apollo* induit l'activation de la DDR et l'apparition d'anomalies structurales au niveau des télomères dans les cellules de fibrosarcome humain HT1080 (Kermasson et al., 2022; Lenain et al., 2006), dans les fibroblastes humains primaires IMR90 (van Overbeek & de Lange, 2006) et dans les cellules embryonnaires de souris (MEFs) (Akhter et al., 2010; Lam et al., 2010; P. Wu et al., 2010).

Dans notre étude, nous avons montré que la suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules rénales épithéliales HKC8 induit une augmentation du nombre de dommages télomériques et que la transfection stable de la forme sauvage d'*Apollo* (*Apollo*^{WT}) permet de réduire ce nombre au même niveau que dans les cellules HKC8 parentales (**Article Figure 5, Figure 39**). Dans ces cellules, la perte d'expression d'*Apollo* induit plus précisément des fusions de télomères inter-chromosomiques (telomere fusion), des fusions entre chromatides sœurs (sister chromatid fusion) ainsi que des pertes de télomères (telomere loss).

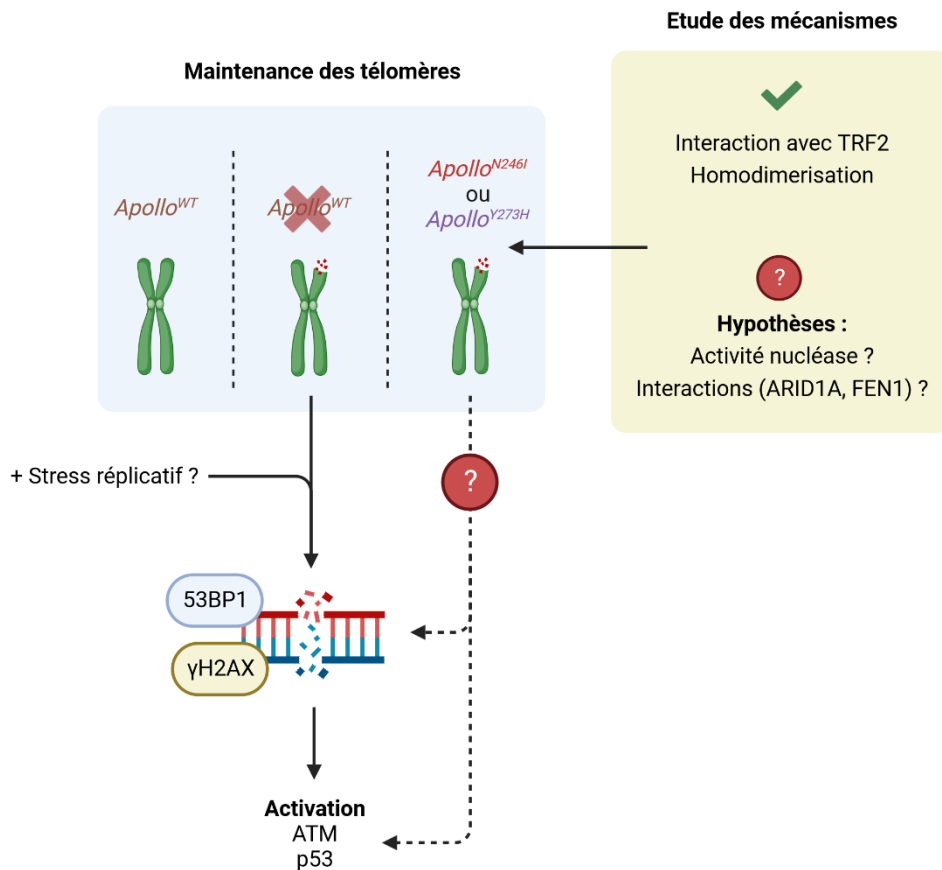


Figure 39 : Schéma récapitulatif des résultats de notre étude sur l'impact de la suppression de l'expression d'*Apollo*^{WT} et de l'expression des formes mutées d'*Apollo* (*Apollo*^{N246I}, *Apollo*^{Y273H}) sur le maintien des télomères dans les cellules HKC8.

La suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 induit un défaut de maintien des télomères. Plusieurs activités d'*Apollo* peuvent être proposées pour expliquer cet effet et sont décrits en détails dans le texte. Les mutations N246I et Y273H induisent également un défaut de maintien des télomères. L'interaction *Apollo*-TRF2 et l'homodimérisation d'*Apollo* ne semblent pas être altérées par les mutations et ne sont donc pas à l'origine de ce défaut. D'autres mécanismes, qui restent à étudier, peuvent expliquer ce défaut dont l'altération de l'activité exonucléase d'*Apollo* et/ou des modifications de ses interactions protéiques. L'accumulation de foci 53BP1 et γH2AX reflètent la présence de DSBs endogènes (détectés en absence de stress génotoxique exogène) dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-}. Ces DSBs peuvent être localisés au niveau des télomères et être le reflet des dommages télomériques induits par l'absence d'*Apollo*. Il est également possible qu'une partie de ces DSBs soit localisée en dehors des télomères et reflètent d'autres sources de stress endogène comme le stress réplicatif. L'activation des voies ATM et p53 en réponse à la suppression de l'expression d'*Apollo* doit être confirmée (résultats préliminaires) mais apparaît comme une réponse logique à la persistance de DSBs. L'impact des mutations N246I et Y273H sur la persistance des DSBs et sur l'activation des voies ATM et p53 est en cours d'étude.

Les fusions inter-chromosomiques sont des anomalies induites par la suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules humaines HT1080 et dans les MEFs et sont considérées comme étant le reflet du rôle d'*Apollo* dans la génération de la structure t-loop post-répllicative, nécessaire à la protection de l'extrémité des chromosomes (Kermasson et al., 2022; Lam et al., 2010; P. Wu et al., 2010, 2012). En effet, la formation de la t-loop nécessite la présence d'une extrémité d'ADN télomérique simple brin protubérante en 3'. La réplication indirecte (sur le brin « lagging ») de l'ADN ne permettant pas une réplication complète de la région terminale des extrémités télomériques, cette protubérance en 3' est supposée se former spontanément pour les nouveaux télomères de type « lagging ». En revanche, la réplication directe (sur le brin « leading ») de l'ADN permet la duplication complète des extrémités télomériques et aboutit à la synthèse de nouveaux télomères de type « leading » présentant des extrémités franches. La génération de la région d'ADN simple brin protubérante en 3' des télomères de type « leading » repose donc sur l'intervention d'une exonucléase 5' vers 3' (de Lange, 2018; Gilson & Géli, 2007). L'étude du mécanisme d'action d'*Apollo* dans les MEFs montre que son activité exonucléase 5' vers 3' participe à la digestion partielle du brin 3' → 5' de l'ADN des télomères de type « leading », issus de la réplication directe de l'ADN (Lam et al., 2010; P. Wu et al., 2010, 2012). D'autre part, la suppression de l'expression d'*Apollo* dans la lignée cellulaire HT1080 induit une diminution de la longueur de la protubérance télomérique en 3' suggérant que ce mécanisme est retrouvé dans des cellules humaines (Kermasson et al., 2022). Le fait que les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} présentent une augmentation du pourcentage de fusions inter-chromosomiques pourrait donc résulter de l'absence de création de l'extrémité d'ADN télomérique simple brin protubérante en 3' des télomères de type « leading ». Cependant, l'état actuel de nos recherches ne nous permet pas de déterminer : (i) quels types de télomères (leading et/ou lagging) sont impliqués dans les fusions inter-chromosomiques observées dans les cellules HKC8 ; et (ii) si l'activité exonucléase d'*Apollo* joue un rôle dans la prévention de ces fusions.

Les fusions entre chromatides sœurs, les pertes de télomères et les multiplications de signal télomérique (MTS) sont des anomalies qui ont déjà été observées dans des cellules cancéreuses humaines (HT1080) exprimant des mutants d'*Apollo* déficients pour son activité exonucléase (Ye et al., 2010). La formation de MTS a également été observée dans des fibroblastes humains

(BJ-hTERT) comme une conséquence de la suppression de l'expression d'*Apollo* (van Overbeek & de Lange, 2006). L'ensemble de ces anomalies a été interprété par l'équipe d'Éric Gilson comme la conséquence de l'implication d'*Apollo* dans la résolution du stress topologique (phénomène de super-enroulement de l'ADN induit par l'avancée de la fourche de réplication vers une structure bloquante de l'ADN) inhérent à la réplication des télomères (Ye et al., 2010). En effet, les télomères sont sensibles au stress réplicatif endogène et sont souvent comparés aux sites fragiles de réplication du génome. Un défaut de résolution de ce stress réplicatif induit ainsi l'apparition d'anomalies télomériques caractéristiques incluant la formation de MTS et des fusions de chromatides sœurs (Gilson & Géli, 2007; Higa et al., 2017; Sfeir et al., 2009). Le fait que les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} présentent une augmentation du pourcentage de fusions de chromatides sœurs et de pertes de télomères pourrait donc être la conséquence d'un rôle d'*Apollo* dans la réplication des télomères dans les cellules épithéliales rénales. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation du pourcentage de MTS dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} par rapport aux cellules HKC8 parentales. Il est toutefois possible que le pourcentage de MTS ait été sous-estimé en raison de la difficulté technique à distinguer deux signaux d'immunofluorescence rapprochés par microscopie. L'hypothèse d'un rôle d'*Apollo* dans la réplication de l'ADN des cellules rénales épithéliales est également supporté par le fait que la diminution de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 induit une légère activation de la voie mitochondriale de l'apoptose en réponse à l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II (**Figure 24**). Or, les travaux de l'équipe d'Éric Gilson ont montré que l'activité d'*Apollo* dans la résolution d'un stress topologique des télomères s'exerce en coopération avec TRF2 et que l'activité combinée de ces deux protéines peut partiellement se substituer à celle de la topoisomérase II alpha dans les cellules HT1080 (Ye et al., 2010). Il est donc possible que l'augmentation de la mort cellulaire induite par la double inhibition d'*Apollo* et de la topoisomérase II dans les cellules HKC8 soit expliquée par un rôle d'*Apollo* dans la résolution d'un stress topologique au niveau des télomères. Il est également possible qu'*Apollo* exerce une fonction dans la résolution d'un stress réplicatif général (télomérique et non télomérique) dans les cellules HKC8. En effet, l'équipe de JoAnn M Sekiguchi a montré qu'*Apollo* est impliqué dans la résolution du stress réplicatif induit par l'aphidicoline, un inhibiteur de l'ADN polymérase, et du stress réplicatif endogène, notamment au niveau de sites fragiles de

réplication tels que FRA3B et FRA16D, dans les cellules cancéreuses humaines HCT116. Dans ces cellules, Apollo joue donc un rôle général dans la réponse au stress répliatif et la diminution du niveau d'expression d'Apollo induit l'apparition de cassures chromosomiques multiples (Mason et al., 2013). Dans notre étude, nous avons montré que la suppression de l'expression d'Apollo induit une augmentation du nombre de foci γ H2AX et 53BP1, reflétant l'activation de la DDR en réponse à des DSBs, dans les cellules HKC8 (**Figure Article 3D**). Ce résultat suggère que l'absence d'Apollo induit la génération de DSBs *de novo* et/ou la persistance de DSBs endogènes non réparés. Quel que soit le type de DSBs détectés, ils peuvent résulter de la formation de cassures chromosomiques. Il est donc probable qu'Apollo joue un rôle dans la résolution du stress répliatif « global » dans les cellules HKC8. Nous pouvons raisonnablement supposer qu'une partie de ces DSBs est localisée au niveau des télomères présentant un défaut de protection en absence d'Apollo dans nos cellules. En effet, la formation de foci de la DDR au niveau des télomères (TIFs) est une réponse induite par l'inhibition d'Apollo dans différents types cellulaires humains (Kermasson et al., 2022; Lenain et al., 2006; van Overbeek & de Lange, 2006) et dans les MEFs (Akhter et al., 2010; Lam et al., 2010; P. Wu et al., 2010). Cependant, il est également possible qu'une partie des DSBs soit localisée en dehors des télomères et puissent refléter un stress endogène non résolu au niveau d'autres sites chromosomiques, par exemple au niveau de sites fragiles de réplication. Il est à noter que le site FRA3B est localisé sur le bras court du chromosome 3 qui est classiquement délété dans les ccRCC (Creighton et al., 2013; Linehan & Ricketts, 2019; Turajlic et al., 2018). Dans tous les cas, il est intéressant de noter que les télomères sont des régions de l'ADN difficiles à répliquer, de façon similaire aux sites fragiles de la réplication (Gilson & Géli, 2007; Higa et al., 2017; Sfeir et al., 2009). Apollo pourrait donc être impliqué dans la résolution du stress répliatif de l'ensemble des sites naturellement difficiles à répliquer dans les cellules HKC8 (**Figure 39**). Pour tester cette hypothèse, nous pourrions commencer par mieux définir la localisation des foci de signalisation de la DDR, induits par l'absence d'Apollo dans nos cellules, en étudiant la co-localisation entre les foci γ H2AX et/ou 53BP1 et : (i) les télomères ; et (ii) des sites fragiles de la réplication (dont FRA3B) en utilisant des sondes ADN spécifiques de ces régions.

Comme décrit précédemment, les pertes de télomères peuvent être la conséquence d'un défaut de résolution du stress réplicatif. Alternativement, il est possible que ces pertes soient le reflet d'un raccourcissement excessif des télomères. La majorité des études fonctionnelles d'*Apollo* dans d'autres modèles cellulaires suggèrent une absence d'activité d'*Apollo* dans le maintien de la longueur des télomères. En effet, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* dans des cellules cancéreuses humaines (HT1080 ou HeLa) et dans des fibroblastes humains n'induit pas de diminution de la longueur moyenne des télomères (Lenain et al., 2006). D'autre part, les fibroblastes ou les cellules du sang issus de patients atteints du syndrome HH (Hoyeraal-Hreidarsson) en lien avec une altération d'*Apollo* (mutation homozygote *Apollo*^{L142S}, mutations hétérozygotes composites *Apollo*^{R122stop/L142F} ou *Apollo*^{R582stop/L142S}, variant d'épissage de l'exon 4 *Apollo*Δ) ne présentent pas non plus de réduction de la longueur moyenne des télomères (Kermasson et al., 2022; Touzot et al., 2010). Cependant, les pertes de télomères ne résultent pas nécessairement en une réduction de la longueur moyenne globale des télomères (Kermasson et al., 2022). Par contre, une diminution de la longueur des télomères les plus courts est décrite comme ayant un impact significatif sur la stabilité chromosomique (Hemann et al., 2001). Dans ce contexte, il est à noter que, pour un des patients HH inclus dans la dernière étude de l'équipe de Patrick Revy, une augmentation de la proportion des télomères les plus courts a été détectée dans les cellules du sang de ce patient (Kermasson et al., 2022). De plus, la suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HT1080 induit une augmentation importante de la proportion des télomères les plus courts (Kermasson et al., 2022). D'autre part, le raccourcissement progressif et physiologique des télomères est un mécanisme classique conduisant à l'entrée en sénescence des cellules (Gilson & Géli, 2007). Or, la diminution de l'expression d'*Apollo* dans des fibroblastes humains primaires induit l'apparition d'un phénotype sénescence caractérisé par une coloration positive à la β-galactosidase et une augmentation du niveau protéique de p21 (van Overbeek & de Lange, 2006). Ce dernier point suggère donc également qu'*Apollo* pourrait jouer un rôle dans la régulation de la longueur des télomères dans les cellules humaines. Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que la perte d'*Apollo* pourrait induire une altération de la longueur des télomères dans les cellules HKC8. Pour tester cette hypothèse, notre équipe collabore actuellement avec Patrick Revy dans

l'objectif de mesurer l'évolution de la longueur des télomères sur plusieurs passages dans les cellules HKC8 en fonction du niveau d'expression d'*Apollo*.

Pour conclure sur cette partie, les différentes anomalies télomériques induites par la suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 ont déjà été observées dans d'autres types cellulaires. Les précédentes études ont majoritairement associé ces anomalies aux rôles d'*Apollo* dans la génération de la t-loop ou dans la réplication des télomères selon des mécanismes dépendants de son activité exonucléase. Il semble donc nécessaire d'étudier le rôle de l'activité exonucléase d'*Apollo* dans l'inhibition des anomalies télomériques présentes dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-}. Pour cela, nous pourrions quantifier le pourcentage des différents types d'anomalies dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} exprimant un mutant d'*Apollo* connu pour avoir un défaut de son activité nucléase, par exemple *Apollo*^{D35N} ou *Apollo*^{D14N}, par comparaison aux cellules HKC8 parentales, aux cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} et aux cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} exprimant *Apollo*^{WT}.

2 - Les mutations N246I et Y273H inhibent l'activité protectrice d'*Apollo* vis-à-vis des télomères

Dans notre étude, nous avons montré que, contrairement à *Apollo*^{WT}, la transfection stable des mutants *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} ne permet pas de diminuer le pourcentage d'anomalies télomériques (**Article Figure 5, Figure 39**). Ces mutants sont donc déficients pour l'activité d'*Apollo* impliquée dans la préservation de l'intégrité des télomères. Les études fonctionnelles réalisées par d'autres laboratoires ont montré qu'*Apollo* interagit avec la protéine du shelterin TRF2 dans des lignées cellulaires humaines (Freibaum & Counter, 2006; Lenain et al., 2006; van Overbeek & de Lange, 2006) et dans les MEFs (P. Wu et al., 2010) et que la localisation d'*Apollo* au niveau des télomères dépend de cette interaction (Lenain et al., 2006; P. Wu et al., 2010). D'autre part, l'équipe de Patrick Revy a récemment montré que des mutations faux-sens du résidu leucine 142 d'*Apollo*, bien que localisé hors du domaine d'interaction avec TRF2, induisaient une diminution de la capacité d'interaction d'*Apollo* avec TRF2 dans la lignée embryonnaire humaine HEK293T (Kermasson et al., 2022). Nous avons donc étudié la possibilité que le défaut de protection des télomères associée à l'expression des mutants *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} dans notre modèle cellulaire soit induite par une diminution

ou une perte d'interaction de ces mutants avec TRF2 empêchant le recrutement d'Apollo aux télomères. En accord avec les précédentes études, nous avons montré qu'Apollo interagit avec TRF2 dans la lignée rénale HKC8 par co-immunoprécipitation suivie d'analyses par spectrométrie de masse et par Western blot (**Article Figure 4A, Tableau 2**). Bien que les résultats obtenus par spectrométrie de masse suggèrent que les mutations N246I et Y273H impactent négativement l'interaction entre Apollo et TRF2, cet effet n'a pas pu être retrouvé de façon statistiquement significative dans nos expériences analysées par Western blot. Notre étude dans son ensemble ne montre donc pas d'impact des mutations N246I et Y273H sur l'interaction entre Apollo et TRF2 dans les cellules HKC8 (**Figure 39**). Cette interaction est décrite comme requise pour la localisation d'Apollo aux télomères. Il est donc peu probable qu'un défaut de localisation d'Apollo au niveau des télomères soit à l'origine des anomalies télomériques associées à l'expression des mutants d'Apollo dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-}. Pour vérifier cette hypothèse, des expériences d'immunofluorescence pourraient être réalisées afin d'étudier la co-localisation des différentes formes d'Apollo avec une des protéines du shelterin comme TRF2 ou TRF1. Compte tenu du statut hétérozygote des mutations chez les patients atteints de ccRCC, il est toutefois intéressant de constater qu'Apollo^{N246I} et Apollo^{Y273H} préservent l'interaction avec TRF2 et peuvent donc probablement être retrouvés dans les complexes Apollo-TRF2 au niveau d'une partie des télomères des cellules de patients. Hormis l'interaction avec TRF2, nous avons montré qu'Apollo interagit avec lui-même pour former des homodimères dans les cellules HKC8 (**Figure 38**). Ce résultat est en accord avec une précédente étude réalisée dans les cellules embryonnaires humaines HEK293T par l'équipe de Titia de Lange (van Overbeek & de Lange, 2006). Nos résultats suggèrent également que les mutants Apollo^{N246I} et Apollo^{Y273H} conservent la capacité d'interagir avec Apollo^{WT}. Un défaut d'homodimérisation ne semble donc pas pouvoir être un mécanisme à l'origine d'un défaut de l'activité d'Apollo dans les cellules des patients hétérozygotes (**Figure 39**). En revanche, il serait intéressant d'étudier la capacité de chaque mutant à former des homodimères Apollo^{N246I}-Apollo^{N246I} ou Apollo^{Y273H}-Apollo^{Y273H}. En effet, la capacité à former des dimères constitués uniquement d'une forme mutante d'Apollo pourrait être à l'origine d'un défaut de protection d'une partie des télomères dans un contexte cellulaire hétérozygote.

D'autre part, il est possible que le défaut de protection des télomères associée à l'expression des mutants *Apollo*^{N246} et *Apollo*^{Y273H} soit expliquée par une altération des interactions entre *Apollo* et les protéines impliquées dans la protection des télomères autres que TRF2 (**Figure 39**). En particulier, nous avons montré que les mutants *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} peuvent interagir avec la protéine ARID1A (AT-Rich Interaction Domain 1A), contrairement à la forme sauvage d'*Apollo*, par spectrométrie de masse (**Tableau 2**). ARID1A est une sous-unité des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF de type BAF (Mathur, 2018; Mullen et al., 2021; Odnokoz et al., 2021). Les complexes BAF sont impliqués dans la régulation de la transcription de nombreux gènes et en particulier dans l'activation de la transcription dépendante des récepteurs aux glucocorticoïdes. ARID1A a été initialement identifiée comme une protéine essentielle à cette activité (Inoue et al., 2002; Nie et al., 2000). D'autre part, ARID1A participe au maintien de l'intégrité des télomères en favorisant la préservation de leur cohésion (Zhao, Lin, et al., 2019) et en limitant leur élongation *via* la répression de *TERT* (Suryo Rahmanto et al., 2016). Pour cette raison, nous avons décidé d'approfondir l'étude de l'interaction entre les formes mutantes d'*Apollo* et ARID1A dans les cellules HKC8. Bien que cette interaction entre : (i) *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H} (exogène) et (ii) ARID1A (endogène) n'ait pas encore pu être confirmée par Western blot, il est possible que cet échec soit dû à un trop faible niveau d'ARID1A endogène co-immunoprécipité qui soit à la limite de détection du Western blot, une technique moins sensible que la spectrométrie de masse. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions réaliser des expériences de surexpression combinée d'*Apollo* et *ARID1A* par co-transfections transitoires dans notre modèle de cellules HKC8 avant les co-immunoprécipitations et analyses par Western blot. De manière intéressante, nos résultats de Western blot ont cependant montré que la surexpression d'*Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H} semble induire une diminution du niveau protéique d'ARID1A dans les cellules HKC8 (**Figure 37**). En plus de l'interaction *Apollo*-ARID1A, il semble donc nécessaire de poursuivre l'étude de l'impact de l'expression d'*Apollo* sur l'expression d'*ARID1A* dans les cellules HKC8 de façon à définir les liens potentiels qui existent entre ces deux régulateurs du maintien des télomères. Nos résultats de spectrométrie de masse suggèrent également qu'*Apollo* pourrait interagir avec FEN1, une endonucléase notamment impliquée dans la résolution du stress répliatif des télomères (Saharia et al., 2008, 2010; Teasley et al., 2015) et dans la régulation de l'activité de

la télomérase (Sampathi et al., 2009) (**Tableau 2**). Il serait intéressant de poursuivre l'étude de la possible interaction entre Apollo et FEN1 dans les cellules HKC8 par Western blot. Il est à noter que FEN1 est un partenaire connu de TRF2, il est donc possible que l'interaction entre Apollo et FEN1 soit indirecte (Saharia et al., 2008).

L'activité exonucléase d'Apollo est décrite comme essentielle à son rôle dans la protection des télomères humains et murins (Lam et al., 2010; P. Wu et al., 2010; Ye et al., 2010). Or, les mutations N246I et Y273H sont respectivement localisées dans les domaines β -CASP et MBL qui recouvrent les séquences protéiques impliquées dans l'activité exonucléase d'Apollo. En particulier, la mutation Y273H se situe à proximité immédiate du résidu asparagine 275 essentiel à l'activité exonucléase d'Apollo *in vitro* (Baddock et al., 2021). Une de nos hypothèses est donc que les mutations induisent une diminution ou une perte de l'activité exonucléase d'Apollo et que ce défaut est à l'origine de l'augmentation du pourcentage d'anomalies télomériques détectée dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} exprimant les formes mutées par comparaison aux mêmes cellules exprimant la forme sauvage d'Apollo. La vérification de cette hypothèse nécessite de pouvoir étudier l'activité exonucléase des formes sauvage et mutées d'Apollo *in vitro*. Pour atteindre cet objectif, notre équipe a déjà tenté de produire la protéine Apollo recombinante dans des bactéries. Nos tentatives n'ont cependant pas abouti, probablement en raison d'une toxicité cellulaire associée à la surexpression d'Apollo, ce qui rend difficile la mise au point de la production et de la purification de la protéine. Pour résoudre ce problème, nous pouvons envisager différentes solutions. L'équipe d'Éric Gilson est, à ma connaissance, la seule équipe ayant réussi à produire et purifier la version entière de la protéine Apollo (Lenain et al., 2006). Plus récemment, l'équipe de Peter J. McHugh a réussi à produire une forme tronquée (acides aminés 1-335) contenant les domaines β -CASP et MBL (Allerston et al., 2015; Baddock et al., 2021). Nous pourrions donc initier une collaboration avec l'une de ces équipes afin de bénéficier de leur expertise concernant la production de la protéine Apollo recombinante. Alternativement ou en parallèle, nous pouvons tenter de mettre au point un test de l'activité nucléase d'Apollo *in vitro* à partir des extraits protéiques de cellules HKC8 +/- *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H} suite à leur immunoprécipitation avec des anticorps anti-Myc ou anti-Flag. Cette méthode pourrait se révéler plus simple que la production de la protéine recombinante. Cependant, nous risquons de co-immunoprécipiter d'autres nucléases

avec Apollo-Myc/Flag et de détecter des activités nucléases non spécifiques. Il sera donc nécessaire d'inclure différents contrôles dont une condition sans surexpression d'*Apollo* (vecteur vide) et une condition avec surexpression d'une forme d'*Apollo* connue pour ne pas posséder d'activité exonucléase, par exemple *Apollo*^{D35N} ou *Apollo*^{D14N}.

II Etude fonctionnelle d'*Apollo* dans la DDR des cellules rénales

1 - Rôle d'*Apollo* dans la réponse cellulaire aux ICLs et DSBs

Dans notre étude, nous avons montré que la diminution ou la suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 induit une augmentation de la sensibilité à long-terme (définie comme la combinaison de la mort et de la prolifération) au cisplatine et à la MMC, des drogues inductrices d'ICLs (**Article Figures 2C, 2D, 3E, 3F, Figure 40**). Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de la sensibilité aux agents inducteurs d'ICLs induite par la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* dans les cellules embryonnaires humaines HEK293T (Bae et al., 2008), les cellules cancéreuses humaines HeLa (Demuth et al., 2004), les fibroblastes humains PD20 (Mason & Sekiguchi, 2011) et dans les lymphocytes B de poulet DT40 (Ishiai et al., 2004). D'autre part, nous avons montré que la diminution ou la suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 n'induit pas de changement de sensibilité à long-terme à l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II agissant comme un inducteur de DSBs (**Article Figures 2E, 3G**). Bien que les précédentes études fonctionnelles aient montré un rôle d'*Apollo* dans la réponse aux DSBs, l'effet de l'inhibition d'*Apollo* sur la sensibilité aux agents inducteurs de DSBs diffère en fonction du type cellulaire. En effet, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit une augmentation de la sensibilité aux IR (Ionizing Radiations) inductrices de DSBs dans les cellules cancéreuses humaines HeLa (Demuth et al., 2004) et U2OS (Salewsky et al., 2012) mais n'impacte pas la sensibilité des cellules embryonnaires humaines HEK293T (Bae et al., 2008) et des cellules lymphocytaires de poulet DT40 (Ishiai et al., 2004). Nos résultats suggèrent que les cellules épithéliales rénales humaines ne présentent pas d'augmentation de sensibilité à long-terme aux DSBs induits par l'étoposide. Il serait cependant intéressant de tester la sensibilité des cellules HKC8 à une autre source de DSBs comme les IR, lesquelles ont l'avantage de générer des DSBs de manière plus directe que l'étoposide.

Notre étude de la sensibilité à long-terme a été réalisée *via* la quantification de la confluence des cellules HKC8 en fonction du temps en utilisant la technologie de l'Incucyte. Cette méthode intègre le suivi de la prolifération et de la mort cellulaire dans une même mesure. En parallèle, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'impact de l'inhibition d'*Apollo* sur les mécanismes d'induction de la mort cellulaire dans les cellules HKC8 en réponse aux drogues génotoxiques par cytométrie en flux après un marquage au DiOC₆(3) (**Figure 40**). Nous avons montré que la diminution de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 induit une augmentation de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose en réponse à l'étoposide, au cisplatine et à la MMC (**Figure 24**). Ces résultats suggèrent que la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit un défaut de la DDR en réponse aux ICLs et aux DSBs dans les cellules HKC8 aboutissant à l'élimination des cellules endommagées par l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. Le fait que la diminution de l'expression d'*Apollo* induise une augmentation de l'activation de l'apoptose en réponse à l'étoposide mais n'impacte pas la sensibilité à long-terme apparaît comme une contradiction. Cependant, cette contradiction pourrait être expliquée par le fait que différentes concentrations et/ou différents temps d'exposition à l'étoposide peuvent induire différentes réponses inégalement impactées par l'expression d'*Apollo*. Alternativement, nous avons montré que l'augmentation de l'induction de l'apoptose dans les cellules HKC8 déplétée pour *Apollo* est significative mais faible. Il est donc possible que cet effet ne soit pas visible dans les expériences réalisées avec l'Incucyte, lesquelles reflètent la mesure de multiples paramètres cellulaires autres que l'apoptose.

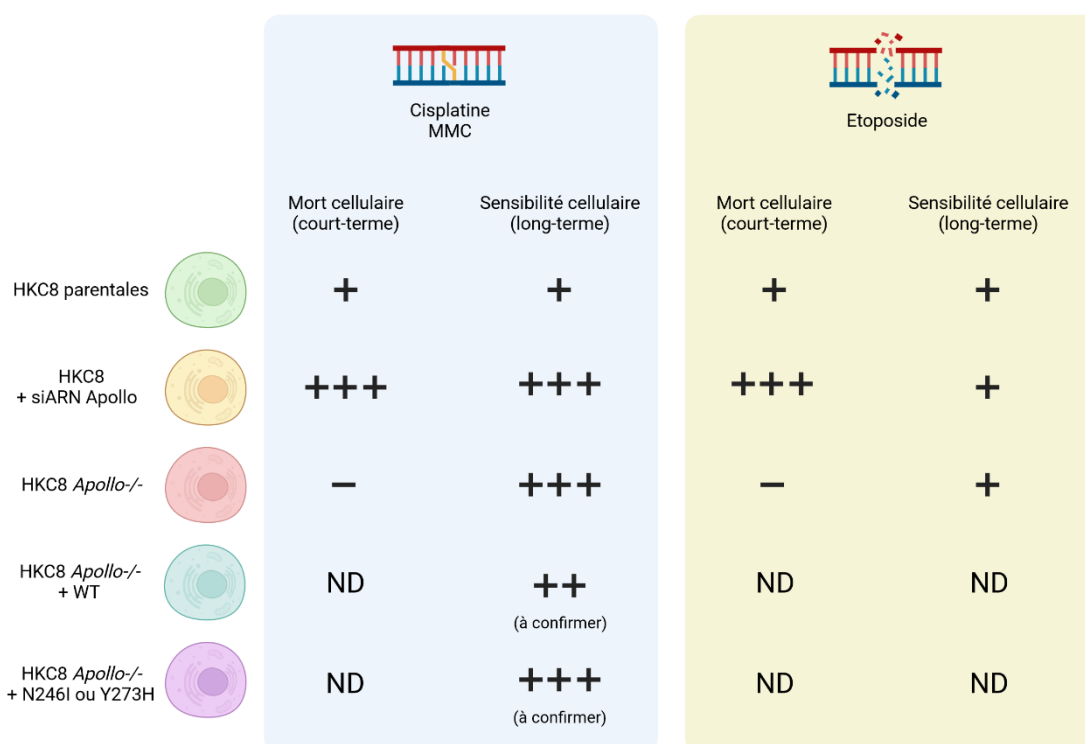


Figure 40 : Schéma récapitulatif de la réponse des cellules HKC8 aux drogues inductrices d'ICLs ou de DSBs en fonction du niveau d'expression et du statut mutationnel d'*Apollo*.

La colonne « mort cellulaire (court-terme) » présente les résultats obtenus dans notre étude de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose par cytométrie en flux. La colonne « sensibilité cellulaire (long-terme) » présente les résultats obtenus dans notre étude de l'évolution de la confluence cellulaire, représentative de la prolifération et de la survie, mesurée avec l'Incucyte. Le signe « + » indique le niveau de la mort et de la sensibilité cellulaires des cellules HKC8 parentales. Ce niveau est utilisé comme référence de comparaison pour les autres conditions. Le signe « +++ » indique une augmentation de la mort ou de la sensibilité cellulaires par rapport aux HKC8 parentales. Le signe « ++ » indique un niveau de mort ou de sensibilité cellulaires intermédiaires entre « + » et « +++ ». Le signe « - » indique une diminution de la mort ou de la sensibilité cellulaires par rapport aux HKC8 parentales. Les résultats obtenus pour les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} exprimant *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H} sont préliminaires et doivent être confirmés. ND : non déterminé.

De façon surprenante, nous avons montré que la suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 induit une diminution de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose en réponse à l'étoposide et au cisplatine (**Figures 26, 40**). Cette réponse est donc à l'opposé de celle induite par la diminution de l'expression d'*Apollo*. Il est possible que cette différence soit expliquée par le ralentissement de la vitesse de prolifération induite par l'inhibition d'*Apollo*.

En effet, la diminution et la suppression de l'expression d'*Apollo* induisent une diminution de la vitesse de prolifération des cellules HKC8 (**Article Figures 2B, 3C**). Cependant, cet effet est plus prononcé en réponse à la suppression de l'expression d'*Apollo*. Or, puisque les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} prolifèrent bien plus lentement que les cellules HKC8, les processus cellulaires tels que la réplication de l'ADN et la mitose sont *a priori* moins fréquents. En conséquence, nous pouvons imaginer que les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} sont moins rapidement affectées par des drogues inductrices d'ICLs puisque ces dommages sont particulièrement délétères au cours de la réplication de l'ADN (Renaudin & Rosselli, 2020). Un raisonnement similaire est valable pour l'interprétation des résultats obtenus suite à un traitement à l'étoposide qui est un inhibiteur de l'ADN topoisomérase II. En effet, cette enzyme intervient dans la résolution des super-enroulements et caténanes d'ADN, des structures se formant notamment au cours de la réplication de l'ADN (Nitiss, 2009). Ainsi, un ralentissement de la vitesse de prolifération induit par l'inhibition de l'expression d'*Apollo* constitue un mécanisme possible expliquant la différence d'induction de la mort cellulaire induite par l'étoposide en fonction de la méthode d'inhibition de l'expression d'*Apollo*. Ce mécanisme permettrait également d'expliquer le fait que la diminution et la suppression de l'expression d'*Apollo* induisent des réponses similaires dans l'étude de la sensibilité à plus long-terme, laquelle permet de réduire l'impact des différences de prolifération à court-terme. Alternativement, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la diminution du niveau d'apoptose observée dans la lignée HKC8 *Apollo*^{-/-} résulte d'un effet « off-target », indépendant de l'expression d'*Apollo* et associé à la marge d'erreur du gARN employé pour l'édition par CRISPR Cas 9. Pour prendre en compte cette possibilité, nous avons également réalisé l'étude de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose avec quatre clones HKC8 issus d'une édition génétique par CRISPR Cas9 avec trois gARN différents : deux clones obtenus par édition de l'exon 1 (HKC8 #1 et HKC8 #2), un clone obtenu par édition de l'exon 2 (HKC8 #3) et un clone obtenu par édition de l'exon 4 (HKC8 #4) (**Figure 25**). Néanmoins, seul le clone #1 a pu être caractérisé comme un clone HKC8 *Apollo*^{-/-} en raison de son absence d'expression d'*Apollo* au niveau transcriptionnel. Le clone #2 inclus un codon stop précoce dans la séquence de l'exon 1 et constitue donc potentiellement un autre clone sans expression d'*Apollo*. Le clone #2 présente le même profil apoptotique que le clone #1 en réponse aux traitements à l'étoposide et au cisplatine. Cependant, le clone #2 a

été généré avec le même gARN que le clone #1 et ne permet donc pas d'éliminer un possible effet « off-target ». Les clones #3 et #4 sont caractérisés par des codons stop précoces localisés dans l'exon 2 et l'exon 4 d'*Apollo*, respectivement. Ces codons stop peuvent théoriquement aboutir à la production de formes tronquées de la protéine *Apollo*. De plus, une partie des transcrits *Apollo* peut subir un épissage alternatif conduisant à l'élimination de l'exon 2 (Demuth et al., 2004). En conséquence, il est possible que le clone #3 conserve une expression partielle d'*Apollo* due à la présence de transcrits dépourvus d'exon 2. Le fait que les clones #3 et #4 présentent des profils apoptotiques différents des clones #1 et #2 pourrait donc être expliqué par la présence résiduelle de protéines tronquées ou d'isoformes provenant de l'épissage alternatif d'*Apollo*. Jusqu'à récemment, aucun anticorps ne permettait de détecter la protéine *Apollo* endogène en Western blot. Il était donc impossible d'étudier la présence de la protéine *Apollo* dans les différents clones générés par CRISPR Cas9. Néanmoins, une étude récente de l'équipe de Han Gong rapporte l'utilisation d'un anticorps de l'entreprise Omnimabs efficace pour la détection de la protéine *Apollo* endogène dans les cellules de poumon humain A549 (Q. Yang et al., 2023). Nous planifions de commander cet anticorps et de le tester sur nos différentes cellules HKC8. Si son efficacité est démontrée, nous pourrons l'utiliser pour caractériser l'expression d'*Apollo* au niveau protéique dans les clones #1, #2, #3 et #4 mais également dans les autres clones non décrits dans cette étude (environ une cinquantaine). Nous pourrons ainsi probablement identifier des clones HKC8 *Apollo*^{-/-} générés avec des gARN différents du clone #1. Alternativement, nous envisageons de réaliser une nouvelle édition par CRISPR Cas9 en utilisant deux gARNs à la fois, localisés aux deux extrémités du gène, de façon à éliminer une large partie du gène *Apollo* et maximiser la probabilité d'obtenir des clones sans expression au niveau transcriptionnel.

A la suite de l'étude du rôle de la forme sauvage d'*Apollo* dans la réponse cellulaire aux drogues inductrices d'ICLs et de DSBs, nous nous sommes intéressés à l'impact des formes mutées sur cette réponse. Cette étude a été initiée avec les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec les différentes formes d'*Apollo* en réponse au cisplatine. Cependant, les résultats obtenus dans les expériences de quantification de l'apoptose et de la sensibilité des cellules à long-terme n'ont pas permis d'observer de différences entre les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées avec un vecteur vide (Mock) et les mêmes cellules

transfectées avec *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H} (**Figure 27**). En particulier, l'absence de différence entre les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + Mock et les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} + ApoWT stables nous a conduit à douter de l'existence d'un lien spécifique entre la suppression de l'expression d'*Apollo* et le phénotype des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} concernant la réponse cellulaire aux ICLs. Cependant, compte tenu du faible niveau de réexpression par transfection stable du transgène *Apollo*^{WT} (et *Apollo*^{N246I} / *Apollo*^{Y273H}) dans la lignée HKC8 *Apollo*^{-/-}, nous avons fait l'hypothèse que ce niveau est insuffisant pour compenser l'effet de la suppression de l'expression d'*Apollo*. Nous avons donc poursuivi l'étude de la réponse cellulaire aux ICLs dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire avec un vecteur vide (Mock) et les vecteurs d'expression d'*Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}. Cette méthode nous a permis d'obtenir des niveaux de réexpression des transgènes largement supérieurs aux niveaux obtenus avec les transfections stables. Les premiers résultats de l'étude de la sensibilité à long-terme suggèrent que la diminution de la prolifération et de la survie observée dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} en absence de traitement est partiellement compensée en réponse à la transfection transitoire d'*Apollo*^{WT} mais pas d'*Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H} (**Figure 28**). De manière similaire, l'augmentation de la sensibilité au cisplatine des cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} semble partiellement inhibée par la transfection transitoire d'*Apollo*^{WT} mais pas par la transfection d'*Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}. Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggèrent que la diminution de prolifération et de survie cellulaires, et l'augmentation de la sensibilité au cisplatine des cellules sont bien en partie induits par la suppression de l'expression d'*Apollo*. D'autre part, il semble que les mutants *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} présentent un défaut d'activité aboutissant à un défaut de survie et de prolifération en absence de stress induit et en réponse aux ICLs (**Figure 40**). Cependant, nos résultats sont préliminaires et doivent être reproduits de façon à vérifier ces premières conclusions. Si celles-ci sont vérifiées, il sera nécessaire de poursuivre l'étude de la sensibilité cellulaire avec d'autres types de drogues inductrices d'ICLs, comme la MMC, et inductrices de DSBs, comme l'étoposide.

2 - Rôle d'*Apollo* dans les voies de signalisation des dommages de l'ADN

En absence de traitements génotoxiques, nous avons également montré que la diminution ou la suppression de l'expression d'*Apollo* induit un stress cellulaire endogène caractérisé par une réduction de la prolifération des cellules HKC8 (**Article Figure 3C**). D'autre part, la suppression

de l'expression d'*Apollo* induit un défaut de la protection des télomères dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} (**Article Figure 5**). Un défaut de cette protection conduit à l'activation de la DDR à l'encontre des télomères (de Lange, 2018; Denchi & de Lange, 2007; Ghilain et al., 2021). Il est donc probable que l'activation anormale de la DDR explique en partie l'émergence du stress cellulaire endogène dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-}. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'impact de la ré-expression d'*Apollo* sur les voies de signalisation des dommages de l'ADN dans ces cellules.

Nous avons montré une activation de la voie de signalisation ATM, caractéristique de la réponse aux DSBs, dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} (**Figure 29**). Cependant, nous n'avons pas observé d'inhibition de l'activation d'ATM dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec *Apollo*^{WT}. Il est donc possible que cette activation de la signalisation ATM soit un effet non spécifique de la suppression de l'expression d'*Apollo*. Alternativement, nous privilégions l'hypothèse selon laquelle le niveau de réexpression d'*Apollo*^{WT} dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable est insuffisant pour compenser l'effet de la suppression d'*Apollo*. En effet, le niveau d'ARNm *Apollo* dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable demeure inférieur à 50% du niveau des ARNm présents dans les cellules HKC8 parentales (**Article Figure 5A**). De plus, les études de la DDR dans les MEFs ont montré que les fusions télomériques induites par la perte de l'expression d'*Apollo* dépendent du mécanisme c-NHEJ (Akhter et al., 2010; Lam et al., 2010) et sont associées à l'activation de la voie ATM (P. Wu et al., 2010). Il ne semble donc pas incohérent que cette réponse puisse être retrouvée dans des cellules humaines. Pour vérifier cette hypothèse, nous planifions de poursuivre l'étude de la voie ATM dans les cellules HKC8 transfectées de façon transitoire de façon à obtenir un niveau de réexpression d'*Apollo* plus élevé.

Compte tenu du rôle central de p53 dans la régulation de la survie et de la mort cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN, nous nous sommes également intéressés à l'étude de la voie de signalisation de p53 dans les cellules HKC8 en fonction du niveau d'expression d'*Apollo*. Nous avons tenté de réaliser cette étude dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon stable avec les vecteurs d'expression d'*Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H} mais nous n'avons pas obtenu de résultats concluants dans ces modèles cellulaires (**Figure**

30). Nous avons donc initié l'étude de la voie de signalisation de p53 dans les cellules HKC8 parentales et HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées de façon transitoire avec nos vecteurs d'expression des différentes formes d'*Apollo*. Nos premiers résultats suggèrent que le défaut de la protection des télomères et la diminution de la prolifération cellulaire induites par la suppression de l'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8 sont associées à une activation de la voie de signalisation de p53 en absence de stress génotoxique induit. En effet, bien que l'activation de p53 dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} soit peu visible au niveau protéique par Western blot, nos premiers résultats montrent une augmentation du clivage de la caspase 3 et une augmentation du niveau des ARNm *p21* et *NOXA* dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} par rapport aux cellules HKC8 parentales (**Figure 32**). Cette augmentation est partiellement compensée par la surexpression transitoire d'*Apollo*^{WT} et semble donc spécifique de la suppression de l'expression d'*Apollo*. Ainsi, il est possible que l'activation de la voie de signalisation de p53 reflète la génération et la persistance des dommages de l'ADN dans les cellules HKC8 favorisant l'induction de l'apoptose (*NOXA*, caspase 3) et l'arrêt du cycle cellulaire (*p21*). Ce mécanisme de régulation serait en accord avec le fait que la suppression de l'expression d'*Apollo* induit un défaut de protection des télomères et une activation persistante des foci de signalisation de la DDR dans les cellules HKC8 (**Figure 39**). L'activation de la voie de signalisation de p53 est un effet qui a été précédemment détecté en lien avec l'activation de la DDR au niveau des télomères dans des fibroblastes humains IMR90 déplétés pour *Apollo* (van Overbeek & de Lange, 2006). Cependant, les résultats concernant l'activation de la voie de signalisation de p53 dans les cellules HKC8 sont préliminaires et doivent donc être reproduits pour confirmer nos premières hypothèses. Il est également important de noter que les résultats de notre première série de transfections transitoires montrent un profil d'activation de la voie de signalisation de p53 similaire entre les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées avec *Apollo*^{WT} et les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-} transfectées avec *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}. Compte tenu du fait que ces dernières cellules présentent un défaut de protection des télomères, il semble surprenant de ne pas observer une tendance à l'augmentation de l'activation de la voie de signalisation de p53. Tout d'abord, il est possible que les résultats de notre première série de transfections transitoires ne soient pas représentatif d'un effet global. Il est donc nécessaire d'acquérir les résultats de répliquats biologiques de façon à affiner les tendances observées.

D'autre part, il est possible que la méthode de réexpression par transfection transitoire ne soit pas la plus adaptée à l'étude de la signalisation dépendante des différentes formes d'Apollo. En effet, les transfections transitoires induisent une toxicité cellulaire qui permet une activation basale de la voie de signalisation de p53 pouvant dissimuler de fines différences de régulation de cette voie. De plus, les transfections transitoires ne nous permettent pas d'étudier des différences de régulation de signalisation sur le long-terme. Finalement, les niveaux de surexpression d'*Apollo* en transfections transitoires peuvent être très variables d'une condition ou d'une série à une autre et constitue une limite à la comparaison des cellules obtenues par différentes transfections. Plusieurs solutions alternatives peuvent être envisagées pour remédier aux limites des transfections transitoires. Nous avons vu que les transfections stables classiques ne permettent pas d'obtenir un niveau suffisant de réexpression d'*Apollo* sur le long-terme. En revanche, nous pourrions tenter d'établir des lignées cellulaires HKC8 stables mais inductibles de façon à éliminer la toxicité cellulaire associée à la surexpression continue d'*Apollo*. Notre équipe de recherche possède également des lignées cellulaires HeLa S3 infectées par des vecteurs viraux codant *Apollo*^{WT}, *Apollo*^{N246I} ou *Apollo*^{Y273H}. Les cellules HeLa ne sont pas dérivées de cellules rénales et semblent donc un modèle d'étude moins pertinent que les cellules HKC8. Néanmoins, nous pourrions nous aider de ces cellules pour étudier la régulation des voies de signalisation en fonction du statut mutationnel d'*Apollo*. Enfin, nous pourrions tenter d'établir une lignée rénale exprimant les différentes versions endogènes d'*Apollo* en utilisant une technique d'édition génomique comme CRISPR Cas9. Bien que cette alternative soit probablement la plus pertinente pour notre étude, elle est également la plus difficile à mettre au point.

Enfin, nous avons montré qu'Apollo est impliqué dans la régulation de la survie ou de la mort cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN induits par des drogues génotoxiques inductrices d'ICLs et de DSBs dans les cellules HKC8. Nous souhaitons donc également étudier l'impact du niveau d'expression d'*Apollo* et de son statut mutationnel sur les voies de signalisation de la DDR (dont ATM et p53) dans les cellules HKC8 en réponse aux stress génotoxiques induits.

III Etude des liens entre Apollo et l'oncogenèse rénale

1 - L'impact d'Apollo sur la stabilité télomérique

Dans cette étude, nous avons montré qu'Apollo est impliqué dans des processus cellulaires participant au maintien de la stabilité du génome dans les cellules rénales épithéliales humaines HKC8. En particulier, nous avons montré qu'Apollo joue un rôle dans le maintien des télomères dans les cellules HKC8 et que les mutants *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} identifiés chez les patients sont déficients pour cette fonction (**Article Figure 5**). L'altération du maintien des télomères associée à la perte d'*Apollo* ou à l'expression des mutants induit l'apparition de diverses anomalies dont des fusions inter- et intra-chromosomiques. Nous pouvons donc conclure qu'un défaut d'*Apollo* constitue un terrain favorable aux réarrangements chromosomiques dans les cellules HKC8. Dans ce contexte, il est à noter que les ccRCC et, de manière plus générale, les RCC, sont caractérisés par des gains et pertes de régions chromosomiques (Creighton et al., 2013; Davis et al., 2014; Linehan & Ricketts, 2019; Linehan WM et al., 2016). Il serait donc intéressant d'examiner le caryotype des cellules tumorales des patients porteurs des mutations d'*Apollo*. Concernant la mécanistique de l'oncogenèse, il est intéressant de noter que l'instabilité télomérique est classiquement décrite comme un événement générateur de clones cellulaires pré-tumoraux ou tumoraux en combinaison avec l'acquisition par ces clones de la capacité à maintenir la longueur de leurs télomères malgré l'augmentation de la prolifération cellulaire de ces clones (Bhargava et al., 2020; Hanahan & Weinberg, 2011; Maciejowski & de Lange, 2017). En effet, l'inhibition de la télomérase dans les cellules somatiques « différenciées » de mammifères induit un raccourcissement progressif des télomères à chaque cycle cellulaire en raison de l'impossibilité de répliquer entièrement la partie terminale des télomères (Gilson & Géli, 2007). Ainsi, l'inhibition de la télomérase constitue un mécanisme de protection, garantissant l'élimination des cellules somatiques vieillissantes et/ou potentiellement dangereuses pour l'organisme, y compris les clones cellulaires pré-tumoraux (Hanahan & Weinberg, 2011). L'acquisition d'une modification génétique ou épigénétique permettant la réexpression de la télomérase dans des cellules somatiques présentant une instabilité télomérique aboutit à l'immortalisation de cellules présentant un haut niveau d'instabilité génomique. Ce mécanisme favorise la transformation tumorale (Bhargava et al., 2020; Maciejowski & de Lange, 2017). Dans le contexte de notre

étude, la combinaison d'un défaut d'*Apollo* et d'un événement ultérieur permettant la réexpression de la télomérase dans les cellules rénales pourrait ainsi constituer un mécanisme initiateur de l'oncogenèse rénale. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de quantifier le niveau d'expression du gène *TERT* dans les tumeurs des patients par immunohistochimie. Il est intéressant de noter que l'étude par séquençage haut-débit de 147 tumeurs ccRCC a montré que ~12% de ces tumeurs présentent une mutation dans le promoteur du gène *TERT*. Dans cette étude, le gène *TERT* constitue le 5^{ème} gène le plus fréquemment altéré après *VHL*, *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1* (Casuscelli et al., 2019). D'autre part, des études incluant 41 et 33 tumeurs RCC, respectivement, ont montré que le niveau transcriptionnel de *TERT* et/ou l'activité de la télomérase, estimée par la quantification des ARNm codant la forme longue et active de la protéine, sont supérieurs dans les tumeurs par rapport aux tissus sains adjacents (Fan et al., 2005; Paradis et al., 2001). Pour l'instant, la quantification des ARNm *TERT* n'a pas permis de mettre en évidence de différence d'expression au niveau transcriptionnelle du gène codant la télomérase entre les cellules HKC8 et HKC8 *Apollo*^{-/-} (résultats non présentés). Ce résultat suggère que la suppression de l'expression d'*Apollo* n'induit pas directement de dérégulation de l'expression de *TERT*. Enfin, il est intéressant de noter que des mutations du promoteur de *TERT* ou d'autres altérations réactivant l'expression de *TERT* sont détectées de façon récurrente dans les tumeurs de patients atteints de mélanomes sporadiques et familiaux (Bhargava et al., 2020; Soura et al., 2016). Le fait que l'un des patients porteurs de la mutation Y273H dans la famille B soit atteint d'un mélanome pourrait donc renforcer notre hypothèse d'une altération d'*Apollo* associée à une altération de l'expression de la télomérase (**Article Figure 1A**).

2 - Les interactions fonctionnelles entre *Apollo* et p53

Notre étude suggère l'existence de liens fonctionnels entre *Apollo* et p53 dans les cellules rénales épithéliales humaines HKC8. En effet, nos premiers résultats semblent montrer que la suppression de l'expression d'*Apollo* induit l'activation de la voie de signalisation de p53 dans les cellules HKC8 (**Figure 32**). Ceci doit être vérifié mais semble cohérent avec le fait que p53 régule l'homéostasie cellulaire en réponse à de multiples stress dont les dommages de l'ADN (Thomas et al., 2022; Vousden & Prives, 2009). A l'inverse, la diminution du niveau d'expression de *p53* semble induire une diminution du niveau d'expression d'*Apollo* au niveau

transcriptionnel dans les cellules HKC8 (**Figure 34D**). Il est donc possible qu'*Apollo* constitue une cible transcriptionnelle directe ou indirecte de p53. Pour tester cette hypothèse, il faudrait cloner le promoteur d'*Apollo* en amont d'un gène rapporteur et étudier le niveau d'expression de ce gène en fonction du niveau d'activation de p53. Enfin, l'analyse des résultats obtenus par spectrométrie de masse suggère l'existence d'une interaction physique directe ou indirecte entre *Apollo* et p53 (**Tableau 2**). Pour l'instant, cette interaction n'a pas pu être vérifiée par Western blot. Cependant, il est possible que cette dernière technique soit moins sensible que la spectrométrie de masse. Il pourrait donc être intéressant d'étudier la potentielle interaction entre *Apollo* et p53 dans des cellules co-transfectées avec des vecteurs d'expression d'*Apollo* et de *p53*. Il est possible que cette double transfection aboutisse à un taux de mortalité cellulaire élevée en raison du rôle pro-apoptotique de p53, mais cette étude d'interaction peut être réalisée sur des temps courts post-transfection. Alternativement, nous pourrions envisager de réaliser ces expériences de co-transfections avec un mutant ponctuel de p53 inactif pour l'induction de l'apoptose.

L'acquisition d'une résistance des cellules à l'arrêt du cycle et à l'induction de la mort cellulaire constitue une des caractéristiques majeures des cellules tumorales. Cette résistance dépend largement de l'inhibition de la voie de signalisation dépendante de p53 (Hanahan & Weinberg, 2011). Ainsi, *p53* est un oncosuppresseur, muté dans environ 50% des cancers chez l'Homme (Aubrey et al., 2018). Concernant les RCC, *p53* est retrouvé parmi les gènes les plus fréquemment altérés dans les chRCC (Davis et al., 2014; Hsieh et al., 2018). En revanche, les mutations de *p53* sont peu fréquentes dans les tumeurs ccRCC (Linehan & Ricketts, 2019; Turajlic et al., 2018). Compte tenu du rôle central de p53 dans la régulation de la mort et de la survie cellulaire, il semble donc probable que les tumeurs ccRCC sans mutations de *p53* présentent d'autres altérations génétiques, en amont ou en aval de p53, conduisant à une inhibition des activités pro-apoptotique et anti-proliférative de p53. Dans cette idée, il est intéressant de noter que dans une étude récente de p53 dans des lignées cellulaires de ccRCC, il a été montré que p53 peut être détecté comme activé (augmentation du niveau et phosphorylation de p53) mais être fonctionnellement inactif (absence de régulation de la prolifération cellulaire et absence d'activité transcriptionnelle) en réponse aux IR dans ces lignées (Diesing et al., 2021). Une autre étude montre que 68% des 448 tumeurs ccRCC incluses

dans la base TCGA (The Cancer Genome Atlas) présentent une altération du nombre de copies chromosomiques d'au moins un gène associé au réseau de régulation de p53 et de la transition G1/S du cycle cellulaire, suggérant que l'altération de la voie de signalisation de p53 peut jouer un rôle important dans le développement des ccRCC (Harlander et al., 2017). Compte tenu des possibles interactions fonctionnelles entre *Apollo* et p53, nous pouvons faire l'hypothèse qu'un défaut d'*Apollo* dans les cellules rénales peut induire une dérégulation fonctionnelle de la voie de signalisation de p53 et constituer un mécanisme qui promeut l'oncogenèse rénale. L'étude des liens entre *Apollo* et p53 dans les cellules HKC8 doit être poursuivie afin de déterminer la pertinence de cette hypothèse.

3 - Les liens entre *Apollo* et les gènes de l'oncogenèse rénale

Notre étude montre l'existence d'une régulation du niveau de transcription ou de stabilité des ARNm *HIF α* en fonction du niveau d'expression d'*Apollo* dans les cellules HKC8. En effet, la diminution du niveau d'expression d'*Apollo* induit une légère diminution de la quantité d'ARNm *HIF1 α* et une diminution importante, d'environ 50%, de la quantité d'ARNm *HIF2 α* dans les cellules HKC8 (**Figure 35**). D'autres part, nos premiers résultats suggèrent que la suppression de l'expression d'*Apollo* induit une augmentation de la quantité d'ARNm *HIF2 α* dans les cellules HKC8 (**Figures 31, 33**). Bien qu'il soit nécessaire de confirmer ces résultats, il est intéressant de noter que différents systèmes d'inhibition d'*Apollo* semblent induire des effets opposés sur l'expression de *HIF2 α* dans les cellules HKC8 : la diminution d'expression d'*Apollo* induit une diminution de l'expression de *HIF2 α* tandis que la suppression de l'expression d'*Apollo* semble induire une augmentation de l'expression de *HIF2 α* . Il est donc possible que la quantité d'ARNm *HIF2 α* soit régulée différemment en fonction du degré d'inhibition (diminution vs suppression de l'expression) et/ou de la durée d'inhibition (temporaire vs constante) d'*Apollo*. Nos résultats suggèrent donc l'existence d'une interaction fonctionnelle « subtile » ou finement régulée entre *Apollo* et *HIF2 α* .

Les facteurs de transcription *HIF α* jouent un rôle central dans le développement des ccRCC (Linehan et al., 2019). D'autre part, parmi les trois facteurs *HIF α* , *HIF2 α* est décrit comme le principal homologue responsable de l'oncogenèse rénale (Choueiri & Kaelin, 2020; Kondo et al., 2003; Raval et al., 2005). L'existence d'un lien entre *Apollo* et *HIF2 α* peut constituer un

mécanisme de régulation de l'oncogenèse chez les patients atteints de ccRCC et porteurs des mutations d'*Apollo*. Pour étudier la relation entre *Apollo* et HIF2 α de manière plus approfondie, nous avons planifié de tester l'impact de l'expression d'*Apollo* sur le niveau protéique d'HIF2 α et sur le niveau d'expression de cibles transcriptionnelles d'HIF2 α . Nous souhaitons également étudier l'impact de l'expression des formes mutées d'*Apollo* identifiées chez les patients atteints de ccRCC sur la régulation de l'expression d'HIF2 α . Enfin, il pourrait être intéressant d'étudier la sensibilité des cellules HKC8 aux inhibiteurs d'HIF2 α en fonction du niveau d'expression et du statut mutationnel d'*Apollo*. Cette étude nous permettrait de définir l'importance fonctionnelle des interactions entre *Apollo* et HIF2 α pour la survie cellulaire et, éventuellement, d'argumenter l'intérêt de l'utilisation d'inhibiteurs de HIF2 α chez les patients porteurs de mutations d'*Apollo*.

Hormis le facteur de transcription HIF α , notre étude suggère l'existence d'interactions protéiques entre *Apollo* et d'autres protéines codées par des gènes impliqués dans l'oncogenèse rénale. En particulier, nous avons identifié une interaction entre les formes *Apollo* mutées et la protéine ARID1A, une sous-unité des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Mathur, 2018; Mullen et al., 2021) (**Tableau 2**). Or, *ARID1A* est classé parmi les gènes les plus fréquemment mutés dans les ccRCC (Linehan & Ricketts, 2019; Turajlic et al., 2018). Ainsi, le fait qu'*Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} puisse spécifiquement interagir avec ARID1A suggère l'existence d'un potentiel gain de fonction des mutants qui pourrait être pertinent dans le contexte de l'oncogenèse rénale. Cependant, comme décrit précédemment, nos tentatives de détection de cette interaction par Western blot n'ont pour l'instant pas abouti et cette étude doit être poursuivie. Dans cette perspective, nous avons planifié de mettre au point des expériences d'immunoprécipitation à partir de cellules HKC8 co-transfectées avec *Apollo* et *ARID1A*.

IV Conclusion

Le gène *DCLRE1B/Apollo* code la protéine Apollo principalement décrite comme impliquée dans le maintien des télomères et dans la réponse aux dommages de l'ADN (DDR). Néanmoins, ses activités n'avaient jamais été étudiées dans un modèle de cellules rénales épithéliales humaines.

Notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années à la recherche de nouveaux gènes de prédisposition au RCC en se basant sur les données génétiques de patients atteints de formes familiales de RCC. L'équipe a ainsi identifié deux variants potentiellement délétères et non précédemment décrits (c.737A>T, p.Asn246Ile noté N246I et c.817T>C, p.Tyr273His noté Y273H) dans le gène *Apollo* chez plusieurs patients de deux familles non apparentées présentant plusieurs cas de ccRCC. Compte tenu des rôles décrits pour Apollo dans des processus liés à la stabilité génomique, nous nous sommes intéressés à l'étude de ses fonctions dans le contexte spécifique des cellules rénales épithéliales humaines HKC8. D'autre part, nous avons étudié les possibles impacts fonctionnels des variants N246I et Y273H sur les fonctions d'Apollo dans ces cellules.

Nous avons montré que la perte d'expression d'*Apollo* induit une instabilité télomérique dans les cellules HKC8. D'autre part, contrairement à la forme sauvage d'*Apollo*, les formes mutées *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} échouent à rétablir une protection des télomères fonctionnelle dans les cellules HKC8 *Apollo*^{-/-}. Nos résultats suggèrent ainsi fortement que les mutations N246I et Y273H peuvent induire une instabilité génomique favorable à l'oncogenèse. Au niveau moléculaire, notre étude ne semble pas indiquer d'impact significatif des mutations d'*Apollo* ni sur sa capacité à interagir avec la protéine du shelterin TRF2, ni sur sa capacité à former des homodimères. L'étude des mécanismes moléculaires à l'origine du défaut de protection des mutants doit donc être poursuivie. Les données de la littérature et nos résultats nous permettent de proposer deux hypothèses concernant ces mécanismes :

- Les mutations N246I et Y273H inhibent partiellement ou totalement l'activité exonucléase d'Apollo décrite comme nécessaire à son rôle de protection des télomères. Pour tester cette hypothèse, il est nécessaire de réaliser l'étude *in vitro* de l'activité

d'Apollo^{WT}, Apollo^{N246I} et Apollo^{Y273H} soit à partir de protéines recombinantes purifiées, soit à partir d'extraits protéiques immunoprécipités ;

- Les mutations N246I et Y273H altèrent les interactions protéiques d'Apollo. En particulier, nos résultats suggèrent que les formes mutantes d'Apollo pourraient acquérir la capacité d'interagir avec ARID1A, une protéine impliquée dans le maintien des télomères et codée par un gène fréquemment muté dans les ccRCC. Pour tester cette hypothèse, nous devons dans un premier temps confirmer les résultats obtenus par spectrométrie de masse en Western blot et étudier de façon plus approfondie les interactions entre les formes d'Apollo et ARID1A.

Notre étude montre également qu'Apollo joue un rôle dans la DDR des cellules HKC8. En effet, l'inhibition d'Apollo induit une augmentation de la sensibilité à long-terme des cellules HKC8 aux drogues inductrices d'ICLs. Nos premiers résultats suggèrent que l'expression des mutants *Apollo*^{N246I} et *Apollo*^{Y273H} ne permet pas de réduire cette sensibilité. D'autre part, l'inhibition d'Apollo induit une altération de l'activation de la mort cellulaire par la voie mitochondriale de l'apoptose des cellules HKC8 en réponse aux drogues inductrices d'ICLs ou de DSBs. A l'échelle moléculaire, nos premiers résultats suggèrent qu'Apollo est impliqué dans la régulation de l'activation des voies ATM et p53 en absence de stress induit. Ces résultats sont cohérents avec le fait qu'Apollo participe au maintien des télomères en inhibant l'activation de la DDR à leur niveau. L'étude du rôle d'Apollo dans la DDR des cellules HKC8 doit être poursuivie afin de :

- Vérifier les résultats obtenus concernant l'induction de la mort cellulaire par la voie mitochondriale de l'apoptose en réponse aux drogues inductrices d'ICLs ou de DSBs dans différentes lignées HKC8 *Apollo*^{-/-} ;
- Vérifier l'implication d'Apollo dans la régulation des voies ATM et p53 dans les cellules HKC8 en absence de stress induit et étendre cette étude dans les cellules HKC8 en réponse aux traitements inducteurs d'ICLs ou des DSBs ;
- Caractériser l'impact des mutations N246I et Y273H sur les voies de signalisation de la DDR associées aux activités d'Apollo.

Enfin, l'ensemble de notre étude montre qu'Apollo joue un rôle dans des processus de maintien de la stabilité du génome dans les cellules HKC8. Or, l'altération de la stabilité du génome est

un processus classique d'induction de l'oncogenèse. Nos résultats montrent en particulier que les mutations N246I et Y273H d'*Apollo* inhibent son activité dans le maintien des télomères et induisent une instabilité chromosomique. Notre hypothèse principale est donc que cette instabilité pourrait être retrouvée dans les cellules rénales épithéliales des patients et participer à l'oncogenèse rénale. D'autre part, notre étude suggère que d'autres mécanismes/processus pourraient participer au développement tumoral dans les cellules mutées pour *Apollo*. En effet, *Apollo* semble posséder de multiples liens fonctionnels avec l'oncosuppresseur p53, un gène majeur de régulation de l'oncogenèse. D'autre part, nous avons montré que l'expression des gènes *Apollo* et *HIF2 α* , l'un des gènes clé du développement des ccRCC, peuvent être liées au niveau transcriptionnel. Finalement, certains de nos résultats préliminaires semblent montrer qu'*Apollo* peut interagir avec des protéines codées par des gènes classiquement mutés dans les RCC (*ARID1A*, *SDHA*). Afin de préciser les mécanismes pouvant être impliqués dans l'oncogenèse rénale chez les patients atteints de ccRCC nous envisageons de :

- Poursuivre l'étude des interactions fonctionnelles et protéiques entre *Apollo* et ces différents acteurs de l'oncogenèse « générale » ou plus spécifiquement rénale, en particulier HIF, p53 et ARID1A
- Caractériser l'impact des mutations N246I et Y273H d'*Apollo* sur ces interactions

Pour conclure, notre étude a permis d'initier la caractérisation fonctionnelle d'*Apollo* dans les cellules rénales épithéliales humaines et argumente en faveur d'un rôle des mutations N246I et Y273H dans la promotion de l'oncogenèse rénale. Cette étude doit être poursuivie afin de déterminer si *Apollo* constitue un nouveau gène de prédisposition au ccRCC.

Bibliographie

- Abdullah, U. B., McGouran, J. F., Brolih, S., Ptchelkine, D., El-Sagheer, A. H., Brown, T., & McHugh, P. J. (2017). RPA activates the XPF-ERCC1 endonuclease to initiate processing of DNA interstrand crosslinks. *The EMBO Journal*, 36(14), 2047-2060. <https://doi.org/10.15252/emj.201796664>
- Akhter, S., Lam, Y. C., Chang, S., & Legerski, R. J. (2010). The telomeric protein SNM1B/Apollo is required for normal cell proliferation and embryonic development. *Aging cell*, 9(6), 1047-1056. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2010.00631.X>
- Akhter, S., & Legerski, R. J. (2008). SNM1A acts downstream of ATM to promote the G1 cell cycle checkpoint. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(1), 236-241. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.130>
- Akhter, S., Richie, C. T., Deng, J. M., Brey, E., Zhang, X., Patrick, C., Behringer, R. R., & Legerski, R. J. (2004). Deficiency in SNM1 abolishes an early mitotic checkpoint induced by spindle stress. *Molecular and cellular biology*, 24(23), 10448-10455. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.23.10448-10455.2004>
- Akhter, S., Richie, C. T., Zhang, N., Behringer, R. R., Zhu, C., & Legerski, R. J. (2005). Snm1-deficient mice exhibit accelerated tumorigenesis and susceptibility to infection. *Molecular and cellular biology*, 25(22), 10071-10078. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.22.10071-10078.2005>
- Allerston, C. K., Lee, S. Y., Newman, J. A., Schofield, C. J., Mchugh, P. J., & Gileadi, O. (2015). The structures of the SNM1A and SNM1B/Apollo nuclease domains reveal a potential basis for their distinct DNA processing activities. *Nucleic acids research*, 43(22), 11047-11060. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1256>
- Alter, B. P., Giri, N., Savage, S. A., & Rosenberg, P. S. (2009). Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood*, 113(26), 6549-6557. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-12-192880>
- Alter, B. P., Giri, N., Savage, S. A., & Rosenberg, P. S. (2018). Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. *Haematologica*, 103(1), 30-39. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2017.178111>
- Amiard, S., Doudeau, M., Pinte, S., Poulet, A., Lenain, C., Faivre-Moskalenko, C., Angelov, D., Hug, N., Vindigni, A., Bouvet, P., Paoletti, J., Gilson, E., & Giraud-Panis, M.-J. (2007). A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nsmb1192>
- Anders, M., Mattow, J., Digweed, M., & Demuth, I. (2009). Evidence for hSNM1B/Apollo functioning in the HSP70 mediated DNA damage response. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(11), 1725-1732. <https://doi.org/10.4161/CC.8.11.8605>
- Andrade, P., Martín, M. J., Juárez, R., López de Saro, F., & Blanco, L. (2009). Limited terminal transferase in human DNA polymerase mu defines the required balance between accuracy and efficiency in NHEJ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16203-16208. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908492106>
- Arias-Lopez, C., Lazaro-Trueba, I., Kerr, P., Lord, C. J., Dexter, T., Iravani, M., Ashworth, A., & Silva, A. (2006). P53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Reports*, 7(2), 219-224. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400587>

- Aubrey, B. J., Kelly, G. L., Janic, A., Herold, M. J., & Strasser, A. (2018). How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 104-113. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>
- Baddock, H. T., Newman, J. A., Yosaatmadja, Y., Bielinski, M., Schofield, C. J., Gileadi, O., & McHugh, P. J. (2021). A phosphate binding pocket is a key determinant of exo- versus endo-nucleolytic activity in the SNM1 nuclease family. *Nucleic acids research*, 49(16), 9294-9309. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB692>
- Baddock, H. T., Yosaatmadja, Y., Newman, J. A., Schofield, C. J., Gileadi, O., & McHugh, P. J. (2020). The SNM1A DNA repair nuclease. *DNA repair*, 95. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2020.102941>
- Bae, J. B., Mukhopadhyay, S. S., Liu, L., Zhang, N., Tan, J., Akhter, S., Liu, X., Shen, X., Li, L., & Legerski, R. J. (2008). Snm1B/Apollo mediates replication fork collapse and S Phase checkpoint activation in response to DNA interstrand cross-links. *Oncogene*, 27(37), 5045-5056. <https://doi.org/10.1038/ONC.2008.139>
- Barber, L. J., Youds, J. L., Ward, J. D., McIlwraith, M. J., O'Neil, N. J., Petalcorin, M. I. R., Martin, J. S., Collis, S. J., Cantor, S. B., Auclair, M., Tissenbaum, H., West, S. C., Rose, A. M., & Boulton, S. J. (2008). RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. *Cell*, 135(2), 261-271. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.016>
- 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. *Experimental Cell Research*, 329(1), 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.003>
- Benarroch-Popivker, D., Pisano, S., Mendez-Bermudez, A., Lototska, L., Kaur, P., Bauwens, S., Djerbi, N., Latrick, C. M., Fraisier, V., Pei, B., Gay, A., Jaune, E., Foucher, K., Cherfils-Vicini, J., Aeby, E., Miron, S., Londoño-Vallejo, A., Ye, J., Le Du, M. H., ... Giraud-Panis, M. J. (2016). TRF2-Mediated Control of Telomere DNA Topology as a Mechanism for Chromosome-End Protection. *Molecular cell*, 61(2), 274-286. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2015.12.009>
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., & Stark, J. M. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genetics*, 4(6), e1000110. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000110>
- Bhargava, R., Fischer, M., O'sullivan, R. J., Harrington, L., & Baird, D. M. (2020). *Genome rearrangements associated with aberrant telomere maintenance A brief Re(cap) of telomeres*. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.02.005>
- Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, 66(6), 801-817. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2017.05.015>
- Budzowska, M., Graham, T. G. W., Soback, A., Waga, S., & Walter, J. C. (2015). Regulation of the Rev1-pol ζ complex during bypass of a DNA interstrand cross-link. *The EMBO Journal*, 34(14), 1971-1985. <https://doi.org/10.15252/embj.201490878>
- Buisson, R., Boisvert, J. L., Benes, C. H., & Zou, L. (2015). Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase. *Molecular Cell*, 59(6), 1011-1024. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.029>
- Bunting, S. F., Callén, E., Wong, N., Chen, H.-T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., Xu, X., Deng, C.-X., Finkel, T., Nussenzweig, M., Stark, J. M., & Nussenzweig, A. (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-

- deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*, 141(2), 243-254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.012>
- Caldecott, K. W. (2022). DNA single-strand break repair and human genetic disease. *Trends in Cell Biology*, 32(9), 733-745. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.04.010>
- Cassier-Chauvat, C., & Moustacchi, E. (1988). Allelism between *pso1-1* and *rev3-1* mutants and between *pso2-1* and *snm1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 13(1), 37-40. <https://doi.org/10.1007/BF00365754>
- Casuscelli, J., Becerra, M. F., Manley, B. J., Zabor, E. C., Reznik, E., Redzematovic, A., Arcila, M. E., Tennenbaum, D. M., Ghanaat, M., Kashan, M., Stief, C. G., Carlo, M., Voss, M. H., Feldman, D. R., Motzer, R. J., Chen, Y., Reuter, V. E., Coleman, J. A., Russo, P., ... Hakimi, A. A. (2019). Characterization and Impact of TERT Promoter Region Mutations on Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma. *European Urology Focus*, 5(4), 642-649. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2017.09.008>
- Caswell, J. L., Camarda, R., Zhou, A. Y., Huntsman, S., Hu, D., Brenner, S. E., Zaitlen, N., Goga, A., & Ziv, E. (2015). Multiple breast cancer risk variants are associated with differential transcript isoform expression in tumors. *Human molecular genetics*, 24(25), 7421-7431. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDV432>
- Cattell, E., Sengerová, B., & McHugh, P. J. (2010). The SNM1/Pso2 family of ICL repair nucleases: From yeast to man. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(6), 635-645. <https://doi.org/10.1002/EM.20556>
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D'Andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology*, 26(1), 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>
- Chabanon, R. M., Morel, D., Eychenne, T., Colmet-Daage, L., Bajrami, I., Dorvault, N., Garrido, M., Meisenberg, C., Lamb, A., Ngo, C., Hopkins, S. R., Roumeliotis, T. I., Jouny, S., Henon, C., Kawai-Kawachi, A., Astier, C., Konde, A., Nery, E. D., Massard, C., ... Postel-Vinay, S. (2021). PBRM1 Deficiency Confers Synthetic Lethality to DNA Repair Inhibitors in Cancer. *Cancer research*, 81(11), 2888-2902. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-0628>
- Chan, K. L., Palmai-Pallag, T., Ying, S., & Hickson, I. D. (2009). Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nature Cell Biology*, 11(6), 753-760. <https://doi.org/10.1038/ncb1882>
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(8), 495-506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., & Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell*, 47(4), 497-510. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.07.029>
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235-263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Chen, L., Nievera, C. J., Lee, A. Y.-L., & Wu, X. (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7713-7720. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710245200>

- Choueiri, T. K., & Kaelin, W. G. (2020). Targeting the HIF2-VEGF axis in renal cell carcinoma. *Nature medicine*, 26(10), 1519-1530. <https://doi.org/10.1038/S41591-020-1093-Z>
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, 40(2), 179-204. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.09.019>
- Couch, F. B., Bansbach, C. E., Driscoll, R., Luzwick, J. W., Glick, G. G., Bétous, R., Carroll, C. M., Jung, S. Y., Qin, J., Cimprich, K. A., & Cortez, D. (2013). ATR phosphorylates SMARCA1 to prevent replication fork collapse. *Genes & Development*, 27(14), 1610-1623. <https://doi.org/10.1101/gad.214080.113>
- Creighton, C. J., Morgan, M., Gunaratne, P. H., Wheeler, D. A., Gibbs, R. A., Robertson, G., Chu, A., Beroukhim, R., Cibulskis, K., Signoretti, S., Vandin, F., Wu, H. T., Raphael, B. J., Verhaak, R. G. W., Tamboli, P., Torres-Garcia, W., Akbani, R., Weinstein, J. N., Reuter, V., ... Sofia, H. J. (2013). Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*, 499(7456), 43-49. <https://doi.org/10.1038/NATURE12222>
- Cui, J., Duan, B., Zhao, X., Chen, Y., Sun, S., Deng, W., Zhang, Y., Du, J., Chen, Y., & Gu, L. (2016). MBD3 mediates epigenetic regulation on EPAS1 promoter in cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(10), 13455-13467. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5237-1>
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- Darroudi, F., Wiegant, W., Meijers, M., Friedl, A. A., van der Burg, M., Fomina, J., van Dongen, J. J. M., van Gent, D. C., & Zdzienicka, M. Z. (2007). Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 615(1), 111-124. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.029>
- Davis, C. F., Ricketts, C. J., Wang, M., Yang, L., Cherniack, A. D., Shen, H., Buhay, C., Kang, H., Kim, S. C., Fahey, C. C., Hacker, K. E., Bhanot, G., Gordenin, D. A., Chu, A., Gunaratne, P. H., Biehl, M., Seth, S., Kaiparettu, B. A., Bristow, C. A., ... Sofia, H. J. (2014). The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer cell*, 26(3), 319-330. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2014.07.014>
- de Lange, T. (2018). Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annual Review of Genetics*, 52, 223-247. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-032918-021921>
- Demidova, E. V., Serebriiskii, I. G., Vlasenkova, R., Kelow, S., Andrade, M. D., Hartman, T. R., Kent, T., Virtucio, J., Rosen, G. L., Pomerantz, R. T., Dunbrack, R. L., Golemis, E. A., Hall, M. J., Chen, D. Y. T., Daly, M. B., & Arora, S. (2023). Candidate variants in DNA replication and repair genes in early-onset renal cell carcinoma patients referred for germline testing. *BMC genomics*, 24(1), 212. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09310-8>
- Demuth, I., Bradshaw, P. S., Lindner, A., Anders, M., Heinrich, S., Kallenbach, J., Schmelz, K., Digweed, M., Meyn, M. S., & Concannon, P. (2008). Endogenous hSNM1B/Apollo interacts with TRF2 and stimulates ATM in response to ionizing radiation. *DNA repair*, 7(8), 1192-1201. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2008.03.020>
- Demuth, I., Digweed, M., & Concannon, P. (2004). Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation. *Oncogene*, 23(53), 8611-8618. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1207895>

- Denchi, E. L., & de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, *448*(7157), Article 7157. <https://doi.org/10.1038/nature06065>
- Deng, Y., Guo, X., Ferguson, D. O., & Chang, S. (2009). Multiple roles for MRE11 at uncapped telomeres. *Nature*, *460*(7257), 914-918. <https://doi.org/10.1038/nature08196>
- Dengler, V. L., Galbraith, M., & Espinosa, J. M. (2014). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *49*(1), 1-15. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.838205>
- Diesing, K., Ribback, S., Winter, S., Gellert, M., Oster, A. M., Stühler, V., Gläser, E., Adler, F., Hartwig, C., Scharpf, M., Bedke, J., Burchardt, M., Schwab, M., Lillig, C. H., & Kroeger, N. (2021). p53 is functionally inhibited in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC): A mechanistic and correlative investigation into genetic and molecular characteristics. *Journal of cancer research and clinical oncology*, *147*(12), 3565-3576. <https://doi.org/10.1007/S00432-021-03786-1>
- Dimitrova, N., & de Lange, T. (2009). Cell cycle-dependent role of MRN at dysfunctional telomeres: ATM signaling-dependent induction of nonhomologous end joining (NHEJ) in G1 and resection-mediated inhibition of NHEJ in G2. *Molecular and cellular biology*, *29*(20), 5552-5563. <https://doi.org/10.1128/MCB.00476-09>
- Doksani, Y., Wu, J. Y., de Lange, T., & Zhuang, X. (2013). Super-Resolution Fluorescence Imaging of Telomeres Reveals TRF2-Dependent T-loop Formation. *Cell*, *155*(2), 345-356. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.048>
- Dronkert, M. L. G., de Wit, J., Boeve, M., Vasconcelos, M. L., van Steeg, H., Tan, T. L. R., Hoeijmakers, J. H. J., & Kanaar, R. (2000). Disruption of mouse SNM1 causes increased sensitivity to the DNA interstrand cross-linking agent mitomycin C. *Molecular and cellular biology*, *20*(13), 4553-4561. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.13.4553-4561.2000>
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., & Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(9), 4273-4278. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4273>
- Engeland, K. (2018). Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death & Differentiation*, *25*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.172>
- Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J. T. F., Tkáč, J., Cook, M. A., Rosebrock, A. P., Munro, M., Canny, M. D., Xu, D., & Durocher, D. (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Molecular Cell*, *49*(5), 872-883. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.001>
- Falck, J., Coates, J., & Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, *434*(7033), 605-611. <https://doi.org/10.1038/nature03442>
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, *410*(6830), 842-847. <https://doi.org/10.1038/35071124>

- Fan, Y., Liu, Z., Fang, X., Ge, Z., Ge, N., Jia, Y., Sun, P., Lou, F., Björkholm, M., Gruber, A., Ekman, P., & Xu, D. (2005). Differential expression of full-length telomerase reverse transcriptase mRNA and telomerase activity between normal and malignant renal tissues. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(12), 4331-4337. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0099>
- Fong, V., Osterbur, M., Capella, C., Kim, Y.-E., Hine, C., Gorbunova, V., Seluanov, A., & Dewhurst, S. (2011). Adenoviral vector driven by a minimal Rad51 promoter is selective for p53-deficient tumor cells. *PLoS One*, *6*(12), e28714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028714>
- Foo, T. K., & Xia, B. (2022). BRCA1-Dependent and Independent Recruitment of PALB2-BRCA2-RAD51 in the DNA Damage Response and Cancer. *Cancer Research*, *82*(18), 3191-3197. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-1535>
- Fouché, N., Cesare, A. J., Willcox, S., Özgür, S., Compton, S. A., & Griffith, J. D. (2006). The Basic Domain of TRF2 Directs Binding to DNA Junctions Irrespective of the Presence of TTAGGG Repeats *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(49), 37486-37495. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608778200>
- Frank, K. M., Sharpless, N. E., Gao, Y., Sekiguchi, J. M., Ferguson, D. O., Zhu, C., Manis, J. P., Horner, J., DePinho, R. A., & Alt, F. W. (2000). DNA Ligase IV Deficiency in Mice Leads to Defective Neurogenesis and Embryonic Lethality via the p53 Pathway. *Molecular Cell*, *5*(6), 993-1002. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80264-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80264-6)
- Freibaum, B. D., & Counter, C. M. (2006). hSnm1B is a novel telomere-associated protein. *The Journal of biological chemistry*, *281*(22), 15033-15036. <https://doi.org/10.1074/JBC.C600038200>
- Freibaum, B. D., & Counter, C. M. (2008). The protein hSnm1B is stabilized when bound to the telomere-binding protein TRF2. *The Journal of biological chemistry*, *283*(35), 23671-23676. <https://doi.org/10.1074/JBC.M800388200>
- Gabai, V. L., O'Callaghan-Sunol, C., Meng, L., Sherman, M. Y., & Yaglom, J. (2008). Triggering Senescence Programs Suppresses Chk1 Kinase and Sensitizes Cells To Genotoxic Stresses. *Cancer Research*, *68*(6), 1834-1842. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5656>
- Gao, Y., Ferguson, D. O., Xie, W., Manis, J. P., Sekiguchi, J., Frank, K. M., Chaudhuri, J., Horner, J., DePinho, R. A., & Alt, F. W. (2000). Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature*, *404*(6780), Article 6780. <https://doi.org/10.1038/35009138>
- García-Rubio, M. L., Pérez-Calero, C., Barroso, S. I., Tumini, E., Herrera-Moyano, E., Rosado, I. V., & Aguilera, A. (2015). The Fanconi Anemia Pathway Protects Genome Integrity from R-loops. *PLoS Genetics*, *11*(11), e1005674. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005674>
- Ged, Y., Chaim, J. L., DiNatale, R. G., Knezevic, A., Kotecha, R. R., Carlo, M. I., Lee, C.-H., Foster, A., Feldman, D. R., Teo, M. Y., Iyer, G., Chan, T., Patil, S., Motzer, R. J., Hakimi, A. A., & Voss, M. H. (2020). DNA damage repair pathway alterations in metastatic clear cell renal cell carcinoma and implications on systemic therapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *8*(1), e000230. <https://doi.org/10.1136/JITC-2019-000230>
- Geng, L., Zhang, X., Zheng, S., & Legerski, R. J. (2007). Artemis links ATM to G2/M checkpoint recovery via regulation of Cdk1-cyclin B. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(7), 2625-2635. <https://doi.org/10.1128/MCB.02072-06>

- Gerlinger, M., Horswell, S., Larkin, J., Rowan, A. J., Salm, M. P., Varela, I., Fisher, R., Mcgranahan, N., Matthews, N., Santos, C. R., Martinez, P., Phillimore, B., Begum, S., Rabinowitz, A., Spencer-Dene, B., Gulati, S., Bates, P. A., Stamp, G., Pickering, L., ... Swanton, C. (2014). Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nature genetics*, *46*(3), 225-233. <https://doi.org/10.1038/NG.2891>
- Ghilain, C., Gilson, E., & Giraud-Panis, M.-J. (2021). Multifunctionality of the Telomere-Capping Shelterin Complex Explained by Variations in Its Protein Composition. *Cells*, *10*(7), 1753. <https://doi.org/10.3390/cells10071753>
- Gilson, E., & Géli, V. (2007). How telomeres are replicated. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrm2259>
- Glousker, G., Briod, A.-S., Quadroni, M., & Lingner, J. (2020). Human shelterin protein POT1 prevents severe telomere instability induced by homology-directed DNA repair. *The EMBO Journal*, *39*(23), e104500. <https://doi.org/10.15252/embj.2020104500>
- Goodarzi, A. A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S. A., Ye, R., Härer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P. A., & Lees-Miller, S. P. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *The EMBO Journal*, *25*(16), 3880-3889. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601255>
- Gordan, J. D., Lal, P., Dondeti, V. R., Letrero, R., Parekh, K. N., Oquendo, C. E., Greenberg, R. A., Flaherty, K. T., Rathmell, W. K., Keith, B., Simon, M. C., & Nathanson, K. L. (2008). HIF- α effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell*, *14*(6), 435-446. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.10.016>
- Gossage, L., Eisen, T., & Maher, E. R. (2015). VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nature Reviews Cancer*, *15*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrc3844>
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., & Lieber, M. R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, *388*(6641), 492-495. <https://doi.org/10.1038/41358>
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(12), a006080. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
- Grimme, J. M., Honda, M., Wright, R., Okuno, Y., Rothenberg, E., Mazin, A. V., Ha, T., & Spies, M. (2010). Human Rad52 binds and wraps single-stranded DNA and mediates annealing via two hRad52-ssDNA complexes. *Nucleic Acids Research*, *38*(9), 2917-2930. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1249>
- Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M. F., & Lieber, M. R. (2007). XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *The EMBO Journal*, *26*(4), 1010-1023. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601559>
- Hafner, A., Bulyk, M. L., Jambhekar, A., & Lahav, G. (2019). The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x>
- Haince, J.-F., McDonald, D., Rodrigue, A., Déry, U., Masson, J.-Y., Hendzel, M. J., & Poirier, G. G. (2008). PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(2), 1197-1208. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706734200>
- Hanada, K., Budzowska, M., Modesti, M., Maas, A., Wyman, C., Essers, J., & Kanaar, R. (2006). The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand

- DNA crosslinks into double-strands breaks. *The EMBO Journal*, 25(20), 4921-4932. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601344>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harlander, S., Schönenberger, D., Toussaint, N. C., Prummer, M., Catalano, A., Brandt, L., Moch, H., Wild, P. J., & Frew, I. J. (2017). Combined mutation in Vhl, Trp53 and Rb1 causes clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nature Medicine*, 23(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nm.4343>
- Hartman, T. R., Demidova, E. V., Lesh, R. W., Hoang, L., Richardson, M., Forman, A., Kessler, L., Speare, V., Golemis, E. A., Hall, M. J., Daly, M. B., & Arora, S. (2020). Prevalence of pathogenic variants in DNA damage response and repair genes in patients undergoing cancer risk assessment and reporting a personal history of early-onset renal cancer. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70449-5>
- Hasumi, H., & Yao, M. (2018). Hereditary kidney cancer syndromes: Genetic disorders driven by alterations in metabolism and epigenome regulation. *Cancer Science*, 109(3), 581-586. <https://doi.org/10.1111/CAS.13503>
- Hazrati, A., Ramis-Castellort, M., Sarkar, S., Barber, L. J., Schofield, C. J., Hartley, J. A., & McHugh, P. J. (2008). Human SNM1A suppresses the DNA repair defects of yeast pso2 mutants. *DNA Repair*, 7(2), 230-238. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.09.013>
- Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L. Y., & Greider, C. W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*, 107(1), 67-77. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00504-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00504-9)
- Hemphill, A. W., Bruun, D., Thrun, L., Akkari, Y., Torimaru, Y., Hejna, K., Jakobs, P. M., Hejna, J., Jones, S., Olson, S. B., & Moses, R. E. (2008). Mammalian SNM1 is required for genome stability. *Molecular Genetics and Metabolism*, 94(1), 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.11.012>
- Henriques, J. A. P., & Moustacchi, E. (1980). ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF pso MUTANTS SENSITIVE TO PHOTO-ADDITION OF PSORALEN DERIVATIVES IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE. *Genetics*, 95(2), 273-288. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/95.2.273>
- Herwest, S., Albers, C., Schmiester, M., Salewsky, B., Hopfenmüller, W., Meyer, A., Bertram, L., & Demuth, I. (2018). The hSNM1B/Apollo variant rs11552449 is associated with cellular sensitivity towards mitomycin C and ionizing radiation. *DNA repair*, 72, 93-98. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2018.09.004>
- Higa, M., Fujita, M., & Yoshida, K. (2017). DNA Replication Origins and Fork Progression at Mammalian Telomeres. *Genes*, 8(4), 112. <https://doi.org/10.3390/genes8040112>
- Hockemeyer, D., Daniels, J.-P., Takai, H., & de Lange, T. (2006). Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell*, 126(1), 63-77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.044>
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366-374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Howlett, N. G., Taniguchi, T., Durkin, S. G., D'Andrea, A. D., & Glover, T. W. (2005). The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Human Molecular Genetics*, 14(5), 693-701. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi065>

- Hsieh, J. J., Le, V., Cao, D., Cheng, E. H., & Creighton, C. J. (2018). Genomic classifications of renal cell carcinoma: A critical step towards the future application of personalized kidney cancer care with pan-omics precision. *The Journal of Pathology*, *244*(5), 525-537. <https://doi.org/10.1002/path.5022>
- Hsieh, J. J., Purdue, M. P., Signoretti, S., Swanton, C., Albiges, L., Schmidinger, M., Heng, D. Y., Larkin, J., & Ficarra, V. (2017). Renal cell carcinoma. *Nature reviews. Disease primers*, *3*. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2017.9>
- Huang, J., Liu, S., Bellani, M. A., Thazhathveetil, A. K., Ling, C., deWinter, J. P., Wang, Y., Wang, W., & Seidman, M. M. (2013). The DNA translocase FANCM/MHF promotes replication traverse of DNA interstrand crosslinks. *Molecular cell*, *52*(3), 434-446. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2013.09.021>
- Inoue, H., Furukawa, T., Giannakopoulos, S., Zhou, S., King, D. S., & Tanese, N. (2002). Largest subunits of the human SWI/SNF chromatin-remodeling complex promote transcriptional activation by steroid hormone receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(44), 41674-41685. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205961200>
- Ip, S. C. Y., Rass, U., Blanco, M. G., Flynn, H. R., Skehel, J. M., & West, S. C. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature*, *456*(7220), 357-361. <https://doi.org/10.1038/nature07470>
- Ishiai, M., Kimura, M., Namikoshi, K., Yamazoe, M., Yamamoto, K., Arakawa, H., Agematsu, K., Matsushita, N., Takeda, S., Buerstedde, J.-M., & Takata, M. (2004). DNA Cross-Link Repair Protein SNM1A Interacts with PIAS1 in Nuclear Focus Formation. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, *24*(24), 10733-10741. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10733-10741.2004>
- Ivanov, A., Cragg, M. S., Erenpreisa, J., Emzinsh, D., Lukman, H., & Illidge, T. M. (2003). Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *Journal of Cell Science*, *116*(20), 4095-4106. <https://doi.org/10.1242/jcs.00740>
- Iyama, T., & Wilson, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, *12*(8), 620-636. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*(7267), 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jensen, R. B., Carreira, A., & Kowalczykowski, S. C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*, *467*(7316), 678-683. <https://doi.org/10.1038/nature09399>
- Jette, N., & Lees-Miller, S. P. (2015). The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *117*(2-3), 194-205. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.003>
- Kakarougkas, A., Ismail, A., Chambers, A. L., Riballo, E., Herbert, A. D., Künzel, J., Löbrich, M., Jeggo, P. A., & Downs, J. A. (2014). Requirement for PBAF in transcriptional repression and repair at DNA breaks in actively transcribed regions of chromatin. *Molecular Cell*, *55*(5), 723-732. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.028>
- Kamai, T., Higashi, S., Murakami, S., Arai, K., Namatame, T., Kijima, T., Abe, H., Jamiyan, T., Ishida, K., Shirataki, H., & Yoshida, K.-I. (2021). Single nucleotide variants of succinate

- dehydrogenase A gene in renal cell carcinoma. *Cancer Science*, 112(8), 3375-3387. <https://doi.org/10.1111/cas.14977>
- Kang, H. J., Kim, H. J., Rih, J.-K., Mattson, T. L., Kim, K. W., Cho, C.-H., Isaacs, J. S., & Bae, I. (2006). BRCA1 plays a role in the hypoxic response by regulating HIF-1 α stability and by modulating vascular endothelial growth factor expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13047-13056. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513033200>
- Kanu, N., Grönroos, E., Martinez, P., Burrell, R. A., Yi Goh, X., Bartkova, J., Maya-Mendoza, A., Mistrík, M., Rowan, A. J., Patel, H., Rabinowitz, A., East, P., Wilson, G., Santos, C. R., McGranahan, N., Gulati, S., Gerlinger, M., Birkbak, N. J., Joshi, T., ... Swanton, C. (2015). SETD2 loss-of-function promotes renal cancer branched evolution through replication stress and impaired DNA repair. *Oncogene*, 34(46), 5699-5708. <https://doi.org/10.1038/ONC.2015.24>
- Karami, S., Han, Y., Pande, M., Cheng, I., Rudd, J., Pierce, B. L., Nutter, E. L., Schumacher, F. R., Kote-Jarai, Z., Lindstrom, S., Witte, J. S., Fang, S., Han, J., Kraft, P., Hunter, D. J., Song, F., Hung, R. J., McKay, J., Gruber, S. B., ... Doherty, J. A. (2016). Telomere structure and maintenance gene variants and risk of five cancer types. *International journal of cancer*, 139(12), 2655-2670. <https://doi.org/10.1002/IJC.30288>
- Kent, T., Mateos-Gomez, P. A., Sfeir, A., & Pomerantz, R. T. (2016). Polymerase θ is a robust terminal transferase that oscillates between three different mechanisms during end-joining. *eLife*, 5, e13740. <https://doi.org/10.7554/eLife.13740>
- Kermasson, L., Churikov, D., Awad, A., Smoom, R., Lainey, E., Touzot, F., Audebert-Bellanger, S., Haro, S., Roger, L., Costa, E., Mouf, M., Bottero, A., Oleastro, M., Abdo, C., de Villartay, J. P., Géli, V., Tzfati, Y., Callebaut, I., Danielian, S., ... Revy, P. (2022). Inherited human Apollo deficiency causes severe bone marrow failure and developmental defects. *Blood*, 139(16), 2427-2440. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2021010791>
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Klein Douwel, D., Boonen, R. A. C. M., Long, D. T., Szybowska, A. A., Räschele, M., Walter, J. C., & Knipscheer, P. (2014). XPF-ERCC1 Acts in Unhooking DNA Interstrand Crosslinks in Cooperation with FANCD2 and FANCP/SLX4. *Molecular Cell*, 54(3), 460-471. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.015>
- Kohno, T., Sakiyama, T., Kunitoh, H., Goto, K., Nishiwaki, Y., Saito, D., Hirose, H., Eguchi, T., Yanagitani, N., Saito, R., Sasaki-Matsumura, R., Mimaki, S., Toyama, K., Yamamoto, S., Kuchiba, A., Sobue, T., Ohta, T., Ohki, M., & Yokota, J. (2006). Association of polymorphisms in the MTH1 gene with small cell lung carcinoma risk. *Carcinogenesis*, 27(12), 2448-2454. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl095>
- Kondo, K., Kim, W. Y., Lechpammer, M., & Kaelin, W. G. (2003). Inhibition of HIF2 α is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biology*, 1(3), E83. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000083>
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E. A., Horikawa, I., Barrett, J. C., & Huang, L. E. (2004). HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *The EMBO Journal*, 23(9), 1949-1956. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600196>
- Kratz, K., Schöpf, B., Kaden, S., Sendoel, A., Eberhard, R., Lademann, C., Cannavó, E., Sartori, A. A., Hengartner, M. O., & Jiricny, J. (2010). Deficiency of FANCD2-associated nuclease

- KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell*, 142(1), 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.022>
- Kristan, A., Debeljak, N., & Kunej, T. (2021). Integration and Visualization of Regulatory Elements and Variations of the EPAS1 Gene in Human. *Genes*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/genes12111793>
- Kunej, T. (2021). Integrative Map of HIF1A Regulatory Elements and Variations. *Genes*, 12(10), 1526. <https://doi.org/10.3390/genes12101526>
- Lachaud, C., Moreno, A., Marchesi, F., Toth, R., Blow, J. J., & Rouse, J. (2016). Ubiquitinated Fancd2 recruits Fan1 to stalled replication forks to prevent genome instability. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6275), 846-849. <https://doi.org/10.1126/science.aad5634>
- Lam, Y. C., Akhter, S., Gu, P., Ye, J., Poulet, A., Giraud-Panis, M. J., Bailey, S. M., Gilson, E., Legerski, R. J., & Chang, S. (2010). SNMIB/Apollo protects leading-strand telomeres against NHEJ-mediated repair. *The EMBO Journal*, 29(13), 2230-2241. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2010.58>
- Laporte, G. A., Leguisamo, N. M., Gloria, H. de C. E., Azambuja, D. B., Kalil, A. N., & Saffi, J. (2020). The role of double-strand break repair, translesion synthesis, and interstrand crosslinks in colorectal cancer progression-clinicopathological data and survival. *Journal of Surgical Oncology*, 121(5), 906-916. <https://doi.org/10.1002/jso.25737>
- Latif, F., Tory, K., Gnarra, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., Schmidt, L., Zhou, F., Li, H., Wei, M. H., Chen, F., Glenn, G., Choyke, P., Walther, M. M., Weng, Y., ... Lerman, M. I. (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5112), 1317-1320. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8493574>
- Lee, L., Perez Oliva, A. B., Martinez-Balsalobre, E., Churikov, D., Peter, J., Rahmouni, D., Audoly, G., Azzoni, V., Audebert, S., Camoin, L., Mulero, V., Cayuela, M. L., Kulathu, Y., Geli, V., & Lachaud, C. (2021). UFMylation of MRE11 is essential for telomere length maintenance and hematopoietic stem cell survival. *Science Advances*, 7(39), eabc7371. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc7371>
- Lenain, C., Bauwens, S., Amiard, S., Brunori, M., Giraud-Panis, M. J., & Gilson, E. (2006). The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Current biology: CB*, 16(13), 1303-1310. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2006.05.021>
- Li, S., Huang, C., Hu, G., Ma, J., Chen, Y., Zhang, J., Huang, Y., Zheng, J., Xue, W., Xu, Y., & Zhai, W. (2020). Tumor-educated B cells promote renal cancer metastasis via inducing the IL-1 β /HIF-2 α /Notch1 signals. *Cell Death & Disease*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2355-x>
- Liang, X. S., Pfeiffer, R. M., Wheeler, W., Maeder, D., Burdette, L., Yeager, M., Chanock, S., Tucker, M. A., Goldstein, A. M., & Yang, X. R. (2012). Genetic variants in DNA repair genes and the risk of cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with/without CDKN2A mutations. *International journal of cancer*, 130(9), 2062-2066. <https://doi.org/10.1002/IJC.26231>
- Lin, W. Y., Wilson, J. H., & Lin, Y. (2013). Repair of chromosomal double-strand breaks by precise ligation in human cells. *DNA Repair*, 12(7), 480-487. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.024>

- Lin, Y., Waldman, B. C., & Waldman, A. S. (2003). Suppression of high-fidelity double-strand break repair in mammalian chromosomes by pifithrin- α , a chemical inhibitor of p53. *DNA Repair*, 2(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00183-0](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00183-0)
- Lindahl, T., & Barnes, D. E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 65, 127-133. <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.127>
- Linehan, W. M., & Ricketts, C. J. (2019). The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: Findings and clinical implications. *Nature Reviews. Urology*, 16(9), 539-552. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0211-5>
- Linehan, W. M., Schmidt, L. S., Crooks, D. R., Wei, D., Srinivasan, R., Lang, M., & Ricketts, C. J. (2019). The Metabolic Basis of Kidney Cancer. *Cancer discovery*, 9(8), 1006-1021. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1354>
- Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ, Creighton CJ, Fei SS, Davis C, Wheeler DA, Murray BA, L, S., CD, V., M, P., AA, A. M., E, S., A, S., S, B., WK, R., AN, B., KA, H., AG, R., ... R, Z. (2016). Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine*, 374(2), 135-145. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1505917>
- Linke, S. P., Sengupta, S., Khabie, N., Jeffries, B. A., Buchhop, S., Miska, S., Henning, W., Pedoux, R., Wang, X. W., Hofseth, L. J., Yang, Q., Garfield, S. H., Stürzbecher, H.-W., & Harris, C. C. (2003). P53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Research*, 63(10), 2596-2605.
- Liu, L., Akhter, S., Bae, J. B., Mukhopadhyay, S. S., Richie, C. T., Liu, X., & Legerski, R. (2009). SNM1B/Apollo interacts with astrin and is required for the prophase cell cycle checkpoint. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(4), 628-638. <https://doi.org/10.4161/CC.8.4.7791>
- Liu, T., Ghosal, G., Yuan, J., Chen, J., & Huang, J. (2010). FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5992), 693-696. <https://doi.org/10.1126/science.1192656>
- Liu, Y., Tavana, O., & Gu, W. (2019). p53 modifications: Exquisite decorations of the powerful guardian. *Journal of molecular cell biology*, 11(7), 564-577. <https://doi.org/10.1093/JMCB/MJZ060>
- Lossaint, G., Larroque, M., Ribeyre, C., Bec, N., Larroque, C., Décaillet, C., Gari, K., & Constantinou, A. (2013). FANCD2 binds MCM proteins and controls replisome function upon activation of S phase checkpoint signaling. *Molecular Cell*, 51(5), 678-690. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.023>
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., & 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(6), 781-794. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00671-2)
- Ma, Y., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2005). The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair*, 4(7), 845-851. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.04.013>
- Maciejowski, J., & de Lange, T. (2017). Telomeres in cancer: Tumour suppression and genome instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2017 18:3, 18(3), 175-186. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.171>

- Mason, J. M., Das, I., Arlt, M., Patel, N., Kraftson, S., Glover, T. W., & Sekiguchi, J. A. M. (2013). The SNM1B/APOLLO DNA nuclease functions in resolution of replication stress and maintenance of common fragile site stability. *Human molecular genetics*, *22*(24), 4901-4913. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDT340>
- Mason, J. M., & Sekiguchi, J. A. M. (2011). Snm1B/Apollo functions in the Fanconi anemia pathway in response to DNA interstrand crosslinks. *Human molecular genetics*, *20*(13), 2549-2559. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDR153>
- Mathur, R. (2018). ARID1A loss in cancer: Towards a mechanistic understanding. *Pharmacology & Therapeutics*, *190*, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.001>
- Matsuoka, S., Huang, M., & Elledge, S. J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(5395), 1893-1897. <https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1893>
- Matta, E., Kiribayeva, A., Khassenov, B., Matkarimov, B. T., & Ishchenko, A. A. (2020). Insight into DNA substrate specificity of PARP1-catalysed DNA poly(ADP-ribosylation). *Scientific Reports*, *10*(1), 3699. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60631-0>
- McEvoy, C. R., Koe, L., Choong, D. Y., Leong, H. S., Xu, H., Karikios, D., Plew, J. D., Prall, O. W., Fellowes, A. P., & Fox, S. B. (2018). SDH-deficient renal cell carcinoma associated with biallelic mutation in succinate dehydrogenase A: Comprehensive genetic profiling and its relation to therapy response. *NPJ Precision Oncology*, *2*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41698-018-0053-2>
- Metcalf, J. L., Bradshaw, P. S., Komosa, M., Greer, S. N., Stephen Meyn, M., & Ohh, M. (2014). K63-ubiquitylation of VHL by SOCS1 mediates DNA double-strand break repair. *Oncogene*, *33*(8), 1055-1065. <https://doi.org/10.1038/ONC.2013.22>
- Michailidou, K., Hall, P., Gonzalez-Neira, A., Ghoussaini, M., Dennis, J., Milne, R. L., Schmidt, M. K., Chang-Claude, J., Bojesen, S. E., Bolla, M. K., Wang, Q., Dicks, E., Lee, A., Turnbull, C., Rahman, N., Fletcher, O., Peto, J., Gibson, L., Dos Santos Silva, I., ... Easton, D. F. (2013). Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nature genetics*, *45*(4), 353-361. <https://doi.org/10.1038/NG.2563>
- Mimori, T., & Hardin, J. A. (1986). Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, *261*(22), 10375-10379.
- Moch, H., Amin, M. B., Berney, D. M., Comp erat, E. M., Gill, A. J., Hartmann, A., Menon, S., Raspollini, M. R., Rubin, M. A., Srigley, J. R., Hoon Tan, P., Tickoo, S. K., Tsuzuki, T., Turajlic, S., Cree, I., & Netto, G. J. (2022). The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European urology*, *82*(5), 458-468. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2022.06.016>
- Moshous, D., Callebaut, I., De Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A., & De Villartay, J. P. (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*, *105*(2), 177-186. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00309-9)
- Motycka, T. A., Bessho, T., Post, S. M., Sung, P., & Tomkinson, A. E. (2004). Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(14), 13634-13639. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313779200>

- Mullen, J., Kato, S., Sicklick, J. K., & Kurzrock, R. (2021). Targeting ARID1A mutations in cancer. *Cancer Treatment Reviews*, *100*, 102287. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102287>
- Muñoz, I. M., Hain, K., Déclais, A.-C., Gardiner, M., Toh, G. W., Sanchez-Pulido, L., Heuckmann, J. M., Toth, R., Macartney, T., Eppink, B., Kanaar, R., Ponting, C. P., Lilley, D. M. J., & Rouse, J. (2009). Coordination of Structure-Specific Nucleases by Human SLX4/BTBD12 Is Required for DNA Repair. *Molecular Cell*, *35*(1), 116-127. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.020>
- Na, J. C., Nagaya, N., Rha, K. H., Han, W. K., & Kim, I. Y. (2019). DNA Damage Response Pathway Alteration in Locally Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma Is Associated With a Poor Outcome. *Clinical Genitourinary Cancer*, *17*(4), 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2019.05.004>
- Naim, V., & Rosselli, F. (2009). The FANCD1 pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nature Cell Biology*, *11*(6), 761-768. <https://doi.org/10.1038/ncb1883>
- Natrajan, R., Williams, R. D., Grigoriadis, A., Mackay, A., Fenwick, K., Ashworth, A., Dome, J. S., Grundy, P. E., Pritchard-Jones, K., & Jones, C. (2007). Delineation of a 1Mb breakpoint region at 1p13 in Wilms tumors by fine-tiling oligonucleotide array CGH. *Genes, chromosomes & cancer*, *46*(6), 607-615. <https://doi.org/10.1002/GCC.20446>
- Nick McElhinny, S. A., Havener, J. M., Garcia-Diaz, M., Juárez, R., Bebenek, K., Kee, B. L., Blanco, L., Kunkel, T. A., & Ramsden, D. A. (2005). A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Molecular Cell*, *19*(3), 357-366. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.012>
- Nie, Z., Xue, Y., Yang, D., Zhou, S., Deroo, B. J., Archer, T. K., & Wang, W. (2000). A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(23), 8879-8888. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.23.8879-8888.2000>
- Niewolik, D., Pannicke, U., Lu, H., Ma, Y., Wang, L.-C. V., Kulesza, P., Zandi, E., Lieber, M. R., & Schwarz, K. (2006). DNA-PKcs dependence of Artemis endonucleolytic activity, differences between hairpins and 5' or 3' overhangs. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(45), 33900-33909. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606023200>
- Nimonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J. L., Wyman, C., Modrich, P., & 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 & Development*, *25*(4), 350-362. <https://doi.org/10.1101/gad.2003811>
- Niraj, J., Färkkilä, A., & D'Andrea, A. D. (2019). The Fanconi Anemia Pathway in Cancer. *Annual review of cancer biology*, *3*(1), 457. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CANCERBIO-030617-050422>
- Nishikawa, H., Wu, W., Koike, A., Kojima, R., Gomi, H., Fukuda, M., & Ohta, T. (2009). BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity. *Cancer Research*, *69*(1), 111-119. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3355>
- Nitiss, J. L. (2009). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews. Cancer*, *9*(5), 327-337. <https://doi.org/10.1038/nrc2608>
- Odnokoz, O., Wavelet-Vermuse, C., Hophan, S. L., Bulun, S., & Wan, Y. (2021). ARID1 proteins: From transcriptional and post-translational regulation to carcinogenesis and potential therapeutics. *Epigenomics*, *13*(10), 809-823. <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0414>

- Opresko, P. L., Kobbe, C. von, Laine, J.-P., Harrigan, J., Hickson, I. D., & Bohr, V. A. (2002). Telomere-binding Protein TRF2 Binds to and Stimulates the Werner and Bloom Syndrome Helicases *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 41110-41119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205396200>
- Ozluk, Y., Taheri, D., Matoso, A., Sanli, O., Berker, N. K., Yakirevich, E., Balasubramanian, S., Ross, J. S., Ali, S. M., & Netto, G. J. (2015). Renal carcinoma associated with a novel succinate dehydrogenase A mutation: A case report and review of literature of a rare subtype of renal carcinoma. *Human Pathology*, 46(12), 1951-1955. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.07.027>
- Palazzo, L., Leidecker, O., Prokhorova, E., Dauben, H., Matic, I., & Ahel, I. (2018). Serine is the major residue for ADP-ribosylation upon DNA damage. *eLife*, 7, e34334. <https://doi.org/10.7554/eLife.34334>
- Palm, W., Hockemeyer, D., Kibe, T., & de Lange, T. (2009). Functional dissection of human and mouse POT1 proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 29(2), 471-482. <https://doi.org/10.1128/MCB.01352-08>
- Pannunzio, N. R., Watanabe, G., & Lieber, M. R. (2018). Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10512-10523. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000374>
- Paradis, V., Bièche, I., Dargère, D., Bonvoust, F., Ferlicot, S., Olivi, M., Lagha, N. B., Blanchet, P., Benoît, G., Vidaud, M., & Bedossa, P. (2001). hTERT expression in sporadic renal cell carcinomas. *The Journal of Pathology*, 195(2), 209-217. <https://doi.org/10.1002/path.917>
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., & Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: Regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1501-1505. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1501>
- 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. G., & Humphrey, T. C. (2014). SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability. *Cell Reports*, 7(6), 2006-2018. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.026>
- Pryor, J. M., Waters, C. A., Aza, A., Asagoshi, K., Strom, C., Mieczkowski, P. A., Blanco, L., & Ramsden, D. A. (2015). Essential role for polymerase specialization in cellular nonhomologous end joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), E4537-4545. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505805112>
- Racusen, L. C., Monteil, C., Sgrignoli, A., Lucskay, M., Marouillat, S., Rhim, J. G. S., & Morin, J. P. (1997). Cell lines with extended in vitro growth potential from human renal proximal tubule: Characterization, response to inducers, and comparison with established cell lines. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 129(3), 318-329. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(97\)90180-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(97)90180-3)
- Rai, R., Hu, C., Broton, C., Chen, Y., Lei, M., & Chang, S. (2017). NBS1 Phosphorylation Status Dictates Repair Choice of Dysfunctional Telomeres. *Molecular cell*, 65(5), 801-817.e4. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2017.01.016>

- Rai, R., Zheng, H., He, H., Luo, Y., Multani, A., Carpenter, P. B., & Chang, S. (2010). The function of classical and alternative non-homologous end-joining pathways in the fusion of dysfunctional telomeres. *The EMBO Journal*, *29*(15), 2598-2610. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.142>
- Räschle, M., Knipsheer, P., Enoiu, M., Angelov, T., Sun, J., Griffith, J. D., Ellenberger, T. E., Schärer, O. D., & Walter, J. C. (2008). Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell*, *134*(6), 969-980. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.08.030>
- Räschle, M., Smeenk, G., Hansen, R. K., Temu, T., Oka, Y., Hein, M. Y., Nagaraj, N., Long, D. T., Walter, J. C., Hofmann, K., Storchova, Z., Cox, J., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., & Mann, M. (2015). DNA repair. Proteomics reveals dynamic assembly of repair complexes during bypass of DNA cross-links. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6234), 1253671. <https://doi.org/10.1126/science.1253671>
- Raval, R. R., Lau, K. W., Tran, M. G. B., Sowter, H. M., Mandriota, S. J., Li, J.-L., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Harris, A. L., & Ratcliffe, P. J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(13), 5675-5686. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5675-5686.2005>
- Reginato, G., & Cejka, P. (2020). The MRE11 complex: A versatile toolkit for the repair of broken DNA. *DNA Repair*, *91-92*, 102869. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102869>
- Renaudin, X., & Rosselli, F. (2020). The FANC/BRCA Pathway Releases Replication Blockades by Eliminating DNA Interstrand Cross-Links. *Genes*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/GENES11050585>
- Revy, P., Kannengiesser, C., & Bertuch, A. A. (2023). Genetics of human telomere biology disorders. *Nature reviews. Genetics*, *24*(2), 86-108. <https://doi.org/10.1038/S41576-022-00527-Z>
- Riballo, E., Kühne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G. C. M., Recio, M. J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., Parker, A. R., Jackson, S. P., Gennery, A., Jeggo, P. A., & Löbrich, M. (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to γ -H2AX foci. *Molecular Cell*, *16*(5), 715-724. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.029>
- Ribes-Zamora, A., Indiviglio, S. M., Mihalek, I., Williams, C. L., & Bertuch, A. A. (2013). TRF2 Interaction with Ku Heterotetramerization Interface Gives Insight into c-NHEJ Prevention at Human Telomeres. *Cell Reports*, *5*(1), 194-206. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.040>
- Richard, S., Gardie, B., Couvé, S., & Gad, S. (2013). Von Hippel-Lindau: How a rare disease illuminates cancer biology. *Seminars in cancer biology*, *23*(1), 26-37. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2012.05.005>
- Richie, C. T., Peterson, C., Lu, T., Hittelman, W. N., Carpenter, P. B., & Legerski, R. J. (2002). hSnm1 colocalizes and physically associates with 53BP1 before and after DNA damage. *Molecular and cellular biology*, *22*(24), 8635-8647. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.24.8635-8647.2002>
- Ricketts, C. J., De Cubas, A. A., Fan, H., Smith, C. C., Lang, M., Reznik, E., Bowlby, R., Gibb, E. A., Akbani, R., Beroukhim, R., Bottaro, D. P., Choueiri, T. K., Gibbs, R. A., Godwin, A. K., Haake, S., Hakimi, A. A., Henske, E. P., Hsieh, J. J., Ho, T. H., ... Mariamidze, A. (2018). The Cancer

- Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports*, 23(1), 313-326.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.03.075>
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S., Haddad, G. G., & Karin, M. (2008). NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature*, 453(7196), Article 7196. <https://doi.org/10.1038/nature06905>
- Rohwer, N., Zasada, C., Kempa, S., & Cramer, T. (2013). The growing complexity of HIF-1 α 's role in tumorigenesis: DNA repair and beyond. *Oncogene*, 32(31), Article 31. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.510>
- Rooney, S., Sekiguchi, J., Zhu, C., Cheng, H.-L., Manis, J., Whitlow, S., DeVido, J., Foy, D., Chaudhuri, J., Lombard, D., & Alt, F. W. (2002). Leaky Scid Phenotype Associated with Defective V(D)J Coding End Processing in Artemis-Deficient Mice. *Molecular Cell*, 10(6), 1379-1390. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00755-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00755-4)
- Roques, C., Coulombe, Y., Delannoy, M., Vignard, J., Grossi, S., Brodeur, I., Rodrigue, A., Gautier, J., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Constantinou, A., & Masson, J. Y. (2009). MRE11-RAD50-NBS1 is a critical regulator of FANCD2 stability and function during DNA double-strand break repair. *The EMBO journal*, 28(16), 2400-2413. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2009.193>
- Ruhland, A., Haase, E., Siede, W., & Brendel, M. (1981). Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard. *Molecular & general genetics: MGG*, 181(3), 346-351. <https://doi.org/10.1007/BF00425609>
- Saharia, A., Guittat, L., Crocker, S., Lim, A., Steffen, M., Kulkarni, S., & Stewart, S. A. (2008). Flap endonuclease 1 contributes to telomere stability. *Current Biology: CB*, 18(7), 496-500. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.071>
- Saharia, A., Teasley, D. C., Duxin, J. P., Dao, B., Chiappinelli, K. B., & Stewart, S. A. (2010). FEN1 ensures telomere stability by facilitating replication fork re-initiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 27057-27066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.112276>
- Saint-Léger, A., Koelblen, M., Civitelli, L., Bah, A., Djerbi, N., Giraud-Panis, M. J., Londono-Vallejo, A., Ascenzioni, F., & Gilson, E. (2014). The basic N-terminal domain of TRF2 limits recombination endonuclease action at human telomeres. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(15), 2469-2474. <https://doi.org/10.4161/CC.29422>
- Saldivar, J. C., Cortez, D., & Cimprich, K. A. (2017). The essential kinase ATR: Ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(10), 622-636. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.67>
- Salewsky, B., Schmiester, M., Schindler, D., Digweed, M., & Demuth, I. (2012). The nuclease hSNM1B/Apollo is linked to the Fanconi anemia pathway via its interaction with FANCP/SLX4. *Human molecular genetics*, 21(22), 4948-4956. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDS338>
- Sampathi, S., Bhusari, A., Shen, B., & Chai, W. (2009). Human flap endonuclease I is in complex with telomerase and is required for telomerase-mediated telomere maintenance. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(6), 3682-3690. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805362200>
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., & Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: Linkage of DNA

- damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1497-1501. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1497>
- Sarek, G., Vannier, J.-B., Panier, S., Petrini, J. H. J., & Boulton, S. J. (2015). TRF2 recruits RTEL1 to telomeres in S phase to promote t-loop unwinding. *Molecular Cell*, 57(4), 622-635. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.024>
- Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., & Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450(7169), 509-514. <https://doi.org/10.1038/nature06337>
- Sato, Y., Yoshizato, T., Shiraishi, Y., Maekawa, S., Okuno, Y., Kamura, T., Shimamura, T., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Suzuki, H., Nagata, Y., Yoshida, K., Kon, A., Suzuki, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Niida, A., Fujimoto, A., Tsunoda, T., ... Ogawa, S. (2013). Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nature Genetics*, 45(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/ng.2699>
- Scanlon, S. E., Hegan, D. C., Sulkowski, P. L., & Glazer, P. M. (2017). Suppression of homology-dependent DNA double-strand break repair induces PARP inhibitor sensitivity in VHL-deficient human renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 9(4), 4647-4660. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.23470>
- Schlacher, K., Wu, H., & Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell*, 22(1), 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.015>
- Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R, Chidambaram A, Bergerheim UR, JT, F., C., C., A, Z., M, B., S, R., CJ, L., ... B, Z. (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature genetics*, 16(1), 68-73. <https://doi.org/10.1038/NG0597-68>
- Schmiester, M., & Demuth, I. (2017). SNM1B/Apollo in the DNA damage response and telomere maintenance. *Oncotarget*, 8(29), 48398-48409. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.16864>
- Schmutz, I., Timashev, L., Xie, W., Patel, D. J., & De Lange, T. (2017). TRF2 binds branched DNA to safeguard telomere integrity. *Nature Structural & Molecular Biology* 2017 24:9, 24(9), 734-742. <https://doi.org/10.1038/NSMB.3451>
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C., & de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): Novel functions for an old molecule. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrm1963>
- Schwab, R. A., Nieminuszczy, J., Shah, F., Langton, J., Lopez Martinez, D., Liang, C.-C., Cohn, M. A., Gibbons, R. J., Deans, A. J., & Niedzwiedz, W. (2015). The Fanconi Anemia Pathway Maintains Genome Stability by Coordinating Replication and Transcription. *Molecular Cell*, 60(3), 351-361. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.012>
- Sebai, M., Tulasne, D., Caputo, S. M., Verkarre, V., Fernandes, M., Guérin, C., Reinhart, F., Adams, S., Maugard, C., Caron, O., Guillaud-Bataille, M., Berthet, P., Bignon, Y.-J., Bressac-de Paillerets, B., Burnichon, N., Chiesa, J., Giraud, S., Lejeune, S., Limacher, J.-M., ... Rouleau, E. (2022). Novel germline MET pathogenic variants in French patients with papillary renal cell carcinomas type I. *Human Mutation*, 43(3), 316-327. <https://doi.org/10.1002/humu.24313>

- Sebesta, M., Burkovics, P., Juhasz, S., Zhang, S., Szabo, J. E., Lee, M. Y. W. T., Haracska, L., & Krejci, L. (2013). Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans. *DNA Repair*, 12(9), 691-698. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.05.001>
- Semenza, G. L. (2010). HIF-1: Upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(1), 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.10.009>
- Semlow, D. R., & Walter, J. C. (2021). Mechanisms of Vertebrate DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Annual Review of Biochemistry*, 90, 107-135. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-080320-112510>
- Sengerová, B., Allerston, C. K., Abu, M., Lee, S. Y., Hartley, J., Kiakos, K., Schofield, C. J., Hartley, J. A., Gileadi, O., & McHugh, P. J. (2012). Characterization of the human SNM1A and SNM1B/Apollo DNA repair exonucleases. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 26254-26267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.367243>
- Sengupta, S., & Harris, C. C. (2005). p53: Traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrm1546>
- Serrano, M. A., Li, Z., Dangeti, M., Musich, P. R., Patrick, S., Roginskaya, M., Cartwright, B., & Zou, Y. (2013). DNA-PK, ATM and ATR collaboratively regulate p53-RPA interaction to facilitate homologous recombination DNA repair. *Oncogene*, 32(19), 2452-2462. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.257>
- Sfeir, A., & de Lange, T. (2012). Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6081), 593-597. <https://doi.org/10.1126/science.1218498>
- Sfeir, A., Kabir, S., van Overbeek, M., Celli, G. B., & de Lange, T. (2010). Loss of Rap1 induces telomere recombination in the absence of NHEJ or a DNA damage signal. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5973), 1657-1661. <https://doi.org/10.1126/science.1185100>
- Sfeir, A., Kosiyatrakul, S. T., Hockemeyer, D., MacRae, S. L., Karlseder, J., Schildkraut, C. L., & de Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell*, 138(1), 90-103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.021>
- Shahi, R. B., De Brakeleer, S., Caljon, B., Pauwels, I., Bonduelle, M., Joris, S., Fontaine, C., Vanhoeij, M., Van Dooren, S., Teugels, E., & De Grève, J. (2019). Identification of candidate cancer predisposing variants by performing whole-exome sequencing on index patients from BRCA1 and BRCA2-negative breast cancer families. *BMC Cancer*, 19(1), 313. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5494-7>
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death & Differentiation*, 22(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
- Shiloh, Y., & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: Regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013 14:4, 14(4), 197-210. <https://doi.org/10.1038/NRM3546>
- Shin, K.-H., Kim, R. H., Kang, M. K., Kim, R. H., Kim, S. G., Lim, P. K., Yochim, J. M., Baluda, M. A., & Park, N.-H. (2007). P53 promotes the fidelity of DNA end-joining activity by, in part, enhancing the expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G. *DNA Repair*, 6(6), 830-840. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.01.013>

- Sirbu, B. M., Lachmayer, S. J., Wülfing, V., Marten, L. M., Clarkson, K. E., Lee, L. W., Gheorghiu, L., Zou, L., Powell, S. N., Dahm-Daphi, J., & Willers, H. (2011). ATR-p53 restricts homologous recombination in response to replicative stress but does not limit DNA interstrand crosslink repair in lung cancer cells. *PloS One*, *6*(8), e23053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023053>
- Sørensen, C. S., Syljuåsen, R. G., Falck, J., Schroeder, T., Rönstrand, L., Khanna, K. K., Zhou, B.-B., Bartek, J., & Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell*, *3*(3), 247-258. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00048-5](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00048-5)
- Soura, E., Eliades, P. J., Shannon, K., Stratigos, A. J., & Tsao, H. (2016). Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Emerging melanoma cancer complexes and genetic counseling. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *74*(3), 411-420; quiz 421-422. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.08.037>
- Stark, J. M., Pierce, A. J., Oh, J., Pastink, A., & Jasin, M. (2004). Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(21), 9305-9316. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9305-9316.2004>
- Stinson, B. M., & Loparo, J. J. (2021). Repair of DNA Double-Strand Breaks by the Nonhomologous End Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, *90*, 137-164. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-080320-110356>
- Stringer, J. R., & Counter, C. M. (2012). Snm1B interacts with PSF2. *PloS one*, *7*(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0049626>
- Sturzenegger, A., Burdova, K., Kanagaraj, R., Levikova, M., Pinto, C., Cejka, P., & Janscak, P. (2014). DNA2 cooperates with the WRN and BLM RecQ helicases to mediate long-range DNA end resection in human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(39), 27314-27326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.578823>
- Sulkowski, P. L., Sundaram, R. K., Oeck, S., Corso, C. D., Liu, Y., Noorbakhsh, S., Niger, M., Boeke, M., Ueno, D., Kalathil, A. N., Bao, X., Li, J., Shuch, B., Bindra, R. S., & Glazer, P. M. (2018). Krebs-cycle-deficient hereditary cancer syndromes are defined by defects in homologous-recombination DNA repair. *Nature genetics*, *50*(8), 1086-1092. <https://doi.org/10.1038/S41588-018-0170-4>
- Suryo Rahmanto, Y., Jung, J.-G., Wu, R.-C., Kobayashi, Y., Heaphy, C. M., Meeker, A. K., Wang, T.-L., & Shih, I.-M. (2016). Inactivating ARID1A Tumor Suppressor Enhances TERT Transcription and Maintains Telomere Length in Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(18), 9690-9699. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.707612>
- Svendsen, J. M., Smogorzewska, A., Sowa, M. E., O'Connell, B. C., Gygi, S. P., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell*, *138*(1), 63-77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.030>
- Tallis, M., Morra, R., Barkauskaite, E., & Ahel, I. (2014). Poly(ADP-ribosyl)ation in regulation of chromatin structure and the DNA damage response. *Chromosoma*, *123*(1), 79-90. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0442-9>
- Tang, M., Bolderson, E., O'Byrne, K. J., & Richard, D. J. (2021). Tumor Hypoxia Drives Genomic Instability. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FCCELL.2021.626229>

- Tang, W., Willers, H., & Powell, S. N. (1999). P53 directly enhances rejoining of DNA double-strand breaks with cohesive ends in gamma-irradiated mouse fibroblasts. *Cancer Research*, 59(11), 2562-2565.
- Teasley, D. C., Parajuli, S., Nguyen, M., Moore, H. R., Alspach, E., Lock, Y. J., Honaker, Y., Saharia, A., Piwnica-Worms, H., & Stewart, S. A. (2015). Flap Endonuclease 1 Limits Telomere Fragility on the Leading Strand. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(24), 15133-15145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.647388>
- Thomas, A. F., Kelly, G. L., & Strasser, A. (2022). Of the many cellular responses activated by TP53, which ones are critical for tumour suppression? *Cell Death and Differentiation*, 29(5), 961-971. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00996-z>
- Toledo, L. I., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukas, C., Larsen, D. H., Povlsen, L. K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., & Lukas, J. (2013). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell*, 155(5), 1088-1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.043>
- Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Catherine Hardebeck, M., Ilcheva, M., Vanessa Camacho, C., Louise Harris, J., Porteus, M., Llorente, B., Khanna, K. K., & Burma, S. (2014). Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice. *Nature Communications*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms4561>
- Touzot, F., Callebaut, I., Soulier, J., Gaillard, L., Azerrad, C., Durandy, A., Fischer, A., De Villartay, J. P., & Revy, P. (2010). Function of Apollo (SNM1B) at telomere highlighted by a splice variant identified in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(22), 10097-10102. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0914918107>
- Tumeurs solides—Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018*. (2019). <https://www.e-cancer.fr/>
- Turajlic, S., Xu, H., Litchfield, K., Rowan, A., Horswell, S., Chambers, T., O'Brien, T., Lopez, J. I., Watkins, T. B. K., Nicol, D., Stares, M., Challacombe, B., Hazell, S., Chandra, A., Mitchell, T. J., Au, L., Eichler-Jonsson, C., Jabbar, F., Soultati, A., ... Swanton, C. (2018). Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell*, 173(3), 595-610.e11. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.03.043>
- van der Groep, P., van Diest, P. J., Smolders, Y. H. C. M., Ausems, M. G. E. M., van der Luijt, R. B., Menko, F. H., Bart, J., de Vries, E. G. E., & van der Wall, E. (2013). HIF-1 α overexpression in ductal carcinoma in situ of the breast in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *PLoS One*, 8(2), e56055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056055>
- Van Ly, D., Low, R. R. J., Frölich, S., Bartolec, T. K., Kafer, G. R., Pickett, H. A., Gaus, K., & Cesare, A. J. (2018). Telomere Loop Dynamics in Chromosome End Protection. *Molecular Cell*, 71(4), 510-525.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.025>
- van Overbeek, M., & de Lange, T. (2006). Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Current biology: CB*, 16(13), 1295-1302. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2006.05.022>
- Vos, M. J., Hageman, J., Carra, S., & Kampinga, H. H. (2008). Structural and Functional Diversities between Members of the Human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ Chaperone Families. *Biochemistry*, 47(27), 7001-7011. <https://doi.org/10.1021/bi800639z>

- Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413-431. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.037>
- Wade, M., Li, Y.-C., & Wahl, G. M. (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 13(2), 83-96. <https://doi.org/10.1038/nrc3430>
- Walton, J., Lawson, K., Prinos, P., Finelli, A., Arrowsmith, C., & Ailles, L. (2023). PBRM1, SETD2 and BAP1—The trinity of 3p in clear cell renal cell carcinoma. *Nature Reviews Urology*, 20(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41585-022-00659-1>
- Wang, A. T., Sengerová, B., Cattell, E., Inagawa, T., Hartley, J. M., Kiakos, K., Burgess-Brown, N. A., Swift, L. P., Enzlin, J. H., Schofield, C. J., Gileadi, O., Hartley, J. A., & McHugh, P. J. (2011). Human SNM1A and XPF-ERCC1 collaborate to initiate DNA interstrand cross-link repair. *Genes & Development*, 25(17), 1859-1870. <https://doi.org/10.1101/gad.15699211>
- Wang, H., Zhang, X., Geng, L., Teng, L., & Legerski, R. J. (2009). Artemis regulates cell cycle recovery from the S phase checkpoint by promoting degradation of cyclin E. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 18236-18243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.002584>
- Wang, J. L., Duboc, C., Wu, Q., Ochi, T., Liang, S., Tsutakawa, S. E., Lees-Miller, S. P., Nadal, M., Tainer, J. A., Blundell, T. L., & Strick, T. R. (2018). Dissection of DNA double-strand-break repair using novel single-molecule forceps. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(6), 482-487. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0065-1>
- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., & Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Research*, 34(21), 6170-6182. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl840>
- Wang, R. C., Smogorzewska, A., & De Lange, T. (2004). Homologous recombination generates t-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell*, 119(3), 355-368. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.011>
- Wang, X., Wang, S.-S., Zhou, L., Yu, L., & Zhang, L.-M. (2016). A network-pathway based module identification for predicting the prognosis of ovarian cancer patients. *Journal of Ovarian Research*, 9(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0285-0>
- West, S. C., Blanco, M. G., Chan, Y. W., Matos, J., Sarbajna, S., & Wyatt, H. D. M. (2015). Resolution of Recombination Intermediates: Mechanisms and Regulation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 80, 103-109. <https://doi.org/10.1101/sqb.2015.80.027649>
- Williams, A. B., & Schumacher, B. (2016). P53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(5), a026070. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026070>
- Wu, L., & Hickson, I. D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, 426(6968), 870-874. <https://doi.org/10.1038/nature02253>
- Wu, P., Takai, H., & De Lange, T. (2012). Telomeric 3' overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. *Cell*, 150(1), 39-52. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.05.026>
- Wu, P., van Overbeek, M., Rooney, S., & de Lange, T. (2010). Apollo contributes to G overhang maintenance and protects leading-end telomeres. *Molecular cell*, 39(4), 606-617. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.06.031>

- Wyatt, D. W., Feng, W., Conlin, M. P., Yousefzadeh, M. J., Roberts, S. A., Mieczkowski, P., Wood, R. D., Gupta, G. P., & Ramsden, D. A. (2016). Essential Roles for Polymerase θ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks. *Molecular Cell*, 63(4), 662-673. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.020>
- Yakirevich, E., Ali, S. M., Mega, A., McMahon, C., Brodsky, A. S., Ross, J. S., Allen, J., Elvin, J. A., Safran, H., & Resnick, M. B. (2015). A Novel SDHA-deficient Renal Cell Carcinoma Revealed by Comprehensive Genomic Profiling. *The American Journal of Surgical Pathology*, 39(6), 858-863. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000403>
- Yan, Y., Akhter, S., Zhang, X., & Legerski, R. (2010). The multifunctional SNM1 gene family: Not just nucleases. *Future oncology (London, England)*, 6(6), 1015-1029. <https://doi.org/10.2217/FON.10.47>
- Yang, K., Moldovan, G.-L., & D'Andrea, A. D. (2010). RAD18-dependent Recruitment of SNM1A to DNA Repair Complexes by a Ubiquitin-binding Zinc Finger*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19085-19091. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.100032>
- Yang, Q., Zhu, W., & Gong, H. (2023). Subtype classification based on t cell proliferation-related regulator genes and risk model for predicting outcomes of lung adenocarcinoma. *Frontiers in Immunology*, 14, 1148483. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1148483>
- Ye, J., Lenain, C., Bauwens, S., Rizzo, A., Saint-Léger, A., Poulet, A., Benarroch, D., Magdinier, F., Morere, J., Amiard, S., Verhoeyen, E., Britton, S., Calsou, P., Salles, B., Bizard, A., Nadal, M., Salvati, E., Sabatier, L., Wu, Y., ... Gilson, E. (2010). TRF2 and apollo cooperate with topoisomerase 2alpha to protect human telomeres from replicative damage. *Cell*, 142(2), 230-242. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.05.032>
- Yu, H., Pak, H., Hammond-Martel, I., Ghram, M., Rodrigue, A., Daou, S., Barbour, H., Corbeil, L., Hébert, J., Drobetsky, E., Masson, J. Y., Di Noia, J. M., & Affar, E. B. (2014). Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 285-290. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1309085110>
- Zarkovic, G., Belousova, E. A., Talhaoui, I., Saint-Pierre, C., Kutuzov, M. M., Matkarimov, B. T., Biard, D., Gasparutto, D., Lavrik, O. I., & Ishchenko, A. A. (2018). Characterization of DNA ADP-ribosyltransferase activities of PARP2 and PARP3: New insights into DNA ADP-ribosylation. *Nucleic Acids Research*, 46(5), 2417-2431. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1318>
- Zhang, F., Fan, Q., Ren, K., & Andreassen, P. R. (2009). PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Molecular Cancer Research: MCR*, 7(7), 1110-1118. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0123>
- Zhang, X., Richie, C., & Legerski, R. J. (2002). Translation of hSNM1 is mediated by an internal ribosome entry site that upregulates expression during mitosis. *DNA Repair*, 1(5), 379-390. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00015-0](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00015-0)
- Zhao, B., Lin, J., Rong, L., Wu, S., Deng, Z., Fatkhutdinov, N., Zundell, J., Fukumoto, T., Liu, Q., Kossenkov, A., Jean, S., Cadungog, M. G., Borowsky, M. E., Drapkin, R., Lieberman, P. M., Abate-Shen, C. T., & Zhang, R. (2019). ARID1A promotes genomic stability through protecting telomere cohesion. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12037-4>
- Zhao, B., Watanabe, G., Morten, M. J., Reid, D. A., Rothenberg, E., & Lieber, M. R. (2019). The essential elements for the noncovalent association of two DNA ends during NHEJ

synapsis. *Nature Communications*, 10(1), 3588. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11507-z>

Zimmermann, M., Kibe, T., Kabir, S., & de Lange, T. (2014). TRF1 negotiates TTAGGG repeat-associated replication problems by recruiting the BLM helicase and the TPP1/POT1 repressor of ATR signaling. *Genes & Development*, 28(22), 2477-2491. <https://doi.org/10.1101/gad.251611.114>

Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5625), 1542-1548. <https://doi.org/10.1126/science.1083430>

Annexes

I Matériels et méthodes complémentaires

1 - Quantification de l'apoptose par cytométrie en flux

L'ensemble des cellules (adhérentes et/ou en suspension) sont collectées par centrifugation à 1000 rpm pendant 5min. Les culots cellulaires sont ensuite resuspendus dans du DiOC₆(3) dilué au 1 :10000 puis incubées pendant 20min à 37°C et 5% CO₂. L'analyse de l'apoptose par cytométrie en flux est réalisée avec un cytomètre BD LSRFortessa™ Cell Analyzer (BD Biosciences) sur la plateforme de cytométrie de l'institut Gustave Roussy. Les cellules apoptotiques sont caractérisées comme les cellules avec un faible marquage au DiOC₆(3) et une petite taille. Le logiciel FlowJo™ (BD Biosciences) est utilisé pour l'analyse des résultats.

2 - Vecteur d'expression flag-Apollo

Le vecteur d'expression p3xFLAG-Myc-CMV-26 contenant la séquence cDNA du gène *DCLRE1B/Apollo* sauvage humain nous a été généreusement fourni par Dr. Patrick Revy. Cette construction permet l'expression de la protéine Apollo fusionnée avec une étiquette flag côté N-terminal.

Pour l'immunoprécipitation de la protéine de fusion flag-Apollo, les extraits protéiques sont incubés avec 40µL de billes ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (A2220, Sigma Aldrich) pendant 2h à 4°C sous agitation. L'élution est réalisée en incubant les billes avec 150ng/µL de FLAG peptide (F4799, Sigma Aldrich). Les autres paramètres du protocole d'immunoprécipitation sont identiques au protocole appliqué à la protéine de fusion Apollo-Myc. Les protocoles de Western blot et de préparation des extraits protéiques pour la spectrométrie de masse sont également identiques.

3 - Edition avec CRISPR Cas9 et séquençage des clones

Le protocole de l'édition génétique par CRISPR Cas9 est détaillé pour le clone #1 dans l'article soumis. Les séquences ciblées par le gARN pour les différents clones et les amorces utilisées pour le séquençage ADN sont listées ci-dessous.

Clone	Exon ciblé	Séquence cible du gARN
Clone #1 Clone #2	Exon 1	5'-ATACGCCCATCGCAGTGGAC-3'
Clone #3	Exon 2	5'-TGACCGTAACCCTCCTCGAT-3'
Clone #4	Exon 4	5'-ACCCTACGATTGCTATCCTT-3'

Tableau 5 : Liste des séquences ADN ciblées par les différents gARN utilisés pour l'édition du gène *Apollo* par la technique CRISPR Cas 9.

Clone	Amorce sens	Amorce anti-sens
Clone #1	5'-GGCCCAATCTTGCTTTCTGC-3'	-
Clone #2	5'-TTTTATCGGGACGCCGTTGT-3'	5'-GTCATAGAATGGGGGCCACG-3'
Clone #3	5'-TTGTACAAAGGGTGGGATGGG-3'	5'-AATCCCAGTGACTTCTCCAGA-3'
Clone #4	5'-GGCAGATGTGTTACAGTGG-3'	5'-TCTTACTCCGAGCTTCGTGC-3'

Tableau 6 : Liste des amorces ADN utilisées pour le séquençage ADN des clones issus de l'édition par CRISPR Cas9.

Le séquençage de chaque séquence ADN a été réalisé avec deux amorces, l'une orientée dans le sens 5' vers 3' (amorce sens), l'autre orientée dans le sens 3' vers 5' (amorce anti-sens). Le clone #1 constitue une exception puisque nous n'avons pas réussi à définir une région d'hybridation correcte avec différentes amorces anti-sens testées.

4 - Listes des anticorps et amorces ADN de RT-qPCR

Les protocoles de Western blots et RT-qPCR sont décrits dans l'article. Les anticorps et amorces des résultats complémentaires sont listés ci-dessous.

Protéine	Espèce	mAc/pAc	Fournisseur	Numéro de catalogue
Apollo	Lapin	pAB	ABclonal	A6808
ARID1A	Lapin	mAc	Cell Signaling	12354
ATM	Lapin	pAc	Merck	07-1286
ATR	Lapin	pAc	Cell Signaling	2790
Actine	Souris	mAc	Sigma	A3854
Caspase 3 clivée	Lapin	mAc	Cell Signaling	9664
flag (peptide)	Lapin	pAc	Cell Signaling	2368
γ H2AX	Souris	mAc	Merck	05-636
Myc (peptide)	Souris	mAc	Cell Signaling	2776
p-ATM (Ser1981)	Souris	mAc	Cell Signaling	4526
p-Chk2 (Thr68)	Lapin	mAc	Cell Signaling	2197
p-p53 (Ser15)	Lapin	pAc	Cell Signaling	9284
TRF2	Lapin	pAb	Novus Biologicals	NB110-57130

Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés dans les Western blots.

Myc et flag sont notés comme peptides de façon à indiquer qu'il s'agit des étiquettes incluses dans les protéines de fusion. Les protéines notées avec le préfixe « p -> » correspondent aux protéines phosphorylées. Les sites de phosphorylation sont indiqués entre parenthèses. mAc : anticorps monoclonal. pAc : anticorps polyclonal.

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
Apollo_1	5'-CACCTCTTGCATCGTCACCT-3'	5'-GGAGGGTTACGGTCATGGTC-3'
Apollo_2	5'-CCTGGTTCTTCCTTCCCGACAA-3'	5'-TCCTTTCCCAGGCTGTAGAGTC-3'
<i>HIF1α</i>	5'-CAGTCGACACAGCCTGGATA-3'	5'-TGTCCTGTGGTGACTTGTCC-3'
<i>HIF2α</i>	5'-TCAAAGGGCCACAGCGACAA-3'	5'-GGCCAGCTCATAGAACACCTC-3'
<i>HPRT1</i>	5'-TTGCTTTCCTTGGTCAGGCA-3'	5'-ATCCAACACTTCGTGGGGTC-3'
<i>Noxa</i>	5'-CTGGAAGTCGAGTGTGCTACT-3'	5'-AGGTTCTGAGCAGAAGAGTT-3'
<i>PPIA</i>	5'-GCCGAGGAAAACCGTGTACT-3'	5'-CTGCAAACAGCTCAAAGGAGAC-3'
<i>p53</i>	5'-CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG-3'	5'-TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC-3'
<i>p21</i>	5'-TAAGGCAGAAGATGTAGAGCG-3'	5'-GGCAGACCAGCATGACAGAT-3'

Tableau 8 : Liste des amorces ADN utilisées dans les RT-qPCR.

Les résultats de RT-qPCR présentés hors de l'article soumis pour les ARNm d'Apollo correspondent à des amplifications réalisées avec les amorces « Apollo_1 ».

